Aus dem Institut für
Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorkommen und Einfluß cellulolytischer Keime im Verdauungskanal konventioneller Ratten und ihre Eignung zur Assoziation von keimfreien Ratten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heidemarie Ratsch
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1985
Journal-Nr. 1164

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0003

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus dem Institut für
Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorkommen und Einfluß cellulolytischer Keime im Verdauungskanal konventioneller Ratten und ihre Eignung zur Assoziation von keimfreien Ratten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heidemarie Ratsch
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1985
Journal-Nr. 1164

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent: Prof. Dr. N.-C. Juhr

Korreferent: Prof. Dr. E. Hellmann

Tag der Promotion: 8. März 1985

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
III.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	24
A.	Material und Methode	
1.	Versuchstiere und Haltung	24
1.1.	Ermittlung zellulosespaltender Keime bei konventionellen Ratten in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters (Fütterungsversuch)	24
1.2.	Besiedlung keimfreier Ratten mit zellulosespaltenden Keimen, isoliert von konventionellen Ratten (Assoziationsversuch)	24
1.3.	Verwertung von C^{14}-markierter Zellulose (Stoffwechselversuch)	25
2.	Fütterungsversuch	26
2.1.	Zusammensetzung des Futters	26
2.2.	Keimzahlbestimmung	27
	Versuchsreihe A	29
	Versuchsreihe B	30
2.3.	Cellulaseaktivität im Blinddarminhalt	31
3.	Isolierung cellulolytischer Keime aus dem Blinddarm konventioneller Ratten	33
3.1.	Anzucht cellulolytischer Bakterien auf Selektivnährböden und Aktivitätsnachweis der Isolate	33
3.2.	Charakterisierung der Isolate	34
4.	Besiedlung keimfreier Ratten mit zellulosespaltenden Keimen, isoliert von konventionellen Ratten (Assoziationsversuch)	34

Seite

5.	Untersuchungen des Besiedlungseffektes	36
5.1.	Gewichte des Magen-Darm-Kanals	36
5.2.	Wassergehalt im Enddarm	36
5.3.	Stickstoffbestimmung im Enddarminhalt	36
5.4.	Zelluloseverwertung	36
5.5.	Cellulolytische Aktivität	37
5.6.	Kultur aus Blinddarminhalt	37
5.7.	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	37
6.	Verwertung von C^{14}-markierter Zellulose (Stoffwechselversuch)	39
B.	Ergebnisse	42
1.1.	Fütterungsversuch	42
	Versuchsreihe A	42
	Versuchsreihe B	45
1.2.	Cellulaseaktivität im Rattenblinddarm	49
2.	Isolierung cellulolytischer Keime aus Blinddarm konventioneller Ratten	51
2.1.	Anzucht auf Selektivnährboden	51
2.2.	Charakterisierung der Isolate	52
3.	Assoziationsversuch	57
3.1.	Besiedlungseffekte auf Körpergewicht, Magen-Darm-Gewichte, Wassergehalt und Stickstoffgehalt im Enddarm	58
3.2.	Cellulolytische Aktivität im Verdauungstrakt assoziierter gnotobiotischer Ratten	67
3.3.	Zelluloseverwertung	68
3.4.	Kultur aus Blinddarminhalt	69
3.5.	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	69
3.6.	Stoffwechselversuch	72

Seite

IV. DISKUSSION 78
V. ZUSAMMENFASSUNG 87
SUMMARY 89
VI. LITERATURVERZEICHNIS 92
VII. ANHANG 108
Lebenslauf 111

I. EINLEITUNG

Die Einschränkung der Nutzung des keimfreien Tieres als Modell durch eine Reihe von Ausfallserscheinungen haben bald zu der Frage geführt, welche Besiedlung geeignet wäre, ein gnotobiotisches Tier zu erzeugen, das auf Grund morphologischer und physiologischer Parameter ein dem konventionellen Tier vergleichbares Modell darstellt.

Dazu ist es erforderlich , nicht nur zu wissen, welche Mikrobenspezies im Darm vorkommen - wo und in welcher Zahl sie existieren und wie ihr Stoffwechsel bei Zufuhr unterschiedlicher Substrate ist - sondern auch, welche Mikrobenspezies notwendig und nützlich für den Wirt sind.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen dienen der Bestimmung und Anwendung cellulolytischer Keime zur definierten Besiedlung keimfreier Laboratoriumsratten. Sie sind ein Beitrag zur Gewinnung von Mikroben mit bekannter Aktivität und bekannten Substratansprüchen sowie zur Ermittlung der Wirkung auf den Wirt und der Reaktion des Wirtes.

II. LITERATURÜBERSICHT

Nur ein gesundes Tier kann ein brauchbares „Meßinstrument" im Versuch sein. Pathogene Erreger , die erst unter der Belastung des Tierversuchs zur Krankheit führen, lassen ihren Einfluß schwer erkennen. Sie können leicht die Ursache von Mißdeutungen im Experiment sein, da ihr Vorhandensein vor dem Experiment nicht ersichtlich war und sie daher als Störfaktoren nicht erkannt wurden (SPIEGEL, 1976). Der entscheidende Durchbruch, gesunde Versuchstiere zu gewinnen, gelang erst auf dem Umweg über das keimfreie Tier, d.h. mit Hilfe der Gnotobiotechnik. Damit wurde ein entscheidender Schritt zur mikrobiellen Definition des Versuchstieres getan, indem im keimfreien Tier Mikroorganismen völlig ausgeschlossen werden und durch gezielten Neuaufbau einer Flora eine definierte mikrobielle Besiedlung erreicht wird. JUHR (1977) bezeichnet das als positive Definition. Die Gesellschaft für Versuchstierkunde empfiehlt deshalb in der Definition des SPF-Tieres, daß der sicherste Weg des Ausschlusses unerwünschter mikrobieller Besiedlung der Weg über das keimfreie Tier ist. Das SPF-Tier ist nicht viel besser definiert als das konventionelle Tier (KOOPMAN, 1976). Von ihm ist nur bekannt, welche Krankheitserreger abwesend sind. Man spricht von negativer Definition. Deshalb ist es notwendig, zu einer standardisierten Mikroflora zu kommen.

VAN DER WAAIJ et al. (1971) versuchten einen anderen Weg, um die Mikroflora besser zu standardisieren. Sie behandelten Mäuse mit Antibiotika, wodurch die aerobe Mikroflora völlig eliminiert werden konnte. Es kamen keine pathogenen Keime mehr vor. Die anaerobe Flora, die sie durch antibiotische Dekontamination mehr oder weniger zufällig erhielten, wird CRF-Flora genannt, CRF

für Colonisation-Resistance-Factor. Die exakte Zusammensetzung dieser Flora ist nicht bekannt. Genau genommen ist diese Flora also nicht standardisiert. Was erreicht werden muß, ist eine Flora, deren verschiedene Komponenten bekannt sind. Diese sollten zu jeder Zeit kultiviert werden können, fordert KOOPMAN (1976).

Die mikrobielle Besiedlung als ein biotischer Umweltfaktor gehört neben den abiotischen Umweltfaktoren (physikalisch-chemische Umwelt) zu den die Reaktion des Versuchstieres beeinflussenden Faktoren. Gerade bei Versuchstieren, die zu experimentellen Untersuchungen von Problemen der Ernährung bzw. Ernährungsphysiologie herangezogen werden, ist der Einfluß der mikrobiellen Besiedlung von großer Bedeutung. So zeigen Untersuchungen von JUHR (1975) und JUHR und HAAS (1979) die Abhängigkeit der Ergebnisse von Verdaulichkeitsbestimmungen bei der Ratte von mikrobieller Aktivität. Bei extremen Bedingungen, wie sie im Experiment herbeigeführt werden, ist mit einer Anpassung der Flora an die Ernährung zu rechnen und mit Einflüssen der Flora auf das Experiment (JUHR, 1979).

Versuche zur Bestimmung der Verdaulichkeit beim konventionellen Tier sind durch den Faktor bakterieller Proteinsynthese belastet und können zu einer Unterbewertung führen. Verdaulichkeitsuntersuchungen beim keimfreien Tier sind durch einen hohen Anteil fäkaler Harnstoffausscheidung und endogenen Stickstoffs belastet (BERGNER et al., 1975; BERGNER, 1982; NYMAN und ASP, 1982).

Organismen, die sich schädlich auf den Wirtsorganismus auswirken, also pathogenen Charakter haben, sind bei der Zucht, der Haltung und im Experiment Störfaktoren. Offensichtlich kranke Versuchstiere sind unbrauchbar, außer wenn die Krankheit des Versuchstieres selbst Gegenstand der Untersuchung ist. Kranke Tiere reagie-

ren im Versuch anders als gesunde; oft sterben während des Versuchsablaufes viele Tiere. Die Aussagekraft des Versuchs wird dadurch beeinträchtigt. Auch können Krankheitssymptome oder Todesfälle als Folgeerscheinungen des Versuches selbst angesehen werden (SPIEGEL, 1976; ZILLMANN, 1977). Beim Vorkommen tierartspezifischer pathogener Keime ist mit einem seuchenhaften Infektionsverlauf und katastrophalen Folgen, besonders unter Bedingungen der Massentierhaltung im Versuchstierbereich, zu rechnen (JUHR, 1977).

Ubiquitäre Keime, die vorübergehend oder dauernd zur Besiedlung konventioneller Tiere gehören, tragen durch ihre konkurrierende Wirkung zur Unterdrückung pathogener Mikroorganismen bei.

In SPF-Zuchten haben diese Keime oft pathogene Wirkung (THUNERT, 1971). Bei einer Assoziation mit nur wenigen Keimen oder aeroben Keimarten zeigen die Tiere in der Massenzucht im Vergleich zu konventionellen Tieren eine verminderte Resistenz gegenüber banalen Keimen wie: Pseudomonas aeroginosa, E. coli, Proteus, Staphylococcus aureus und Streptococcus faecalis, die zu Abszessen oder Diarrhöen mit letalem Ausgang führen. Diese Beobachtungen lassen sich folgendermaßen deuten: Eine Assoziation mit nur wenigen Keimarten führt zu einer labilen Darm- und Hautflora der Tiere. Neu hinzukommende Keime finden keine konkurrierenden Keime vor. Sie vermehren sich zunächst ungehemmt, verdrängen andere vorhandene Keimarten fast ganz und führen bei einem Teil der Tiere zu Erkrankungen (SPIEGEL, 1976; NICOLAI-SCHOLTEN, 1976; PITTERMANN und DEERBERG, 1976).

Ebenso hat die Mikroflora des Wirtes einen Einfluß auf die Angehensrate, die Reproduktion und die Pathogenität verschiedener Protozoen und Helminthen. Es scheint, daß bei Keimfreiheit ein Faktor anwesend ist, der die Entwicklung hemmt (GERBER, 1974).

Das keimfreie Tier wird als ein Versuchstier verwendet, mit dem man die Rolle der Mikroflora genauer analysieren kann; so z. B. in Studien über den wachstumshemmenden Einfluß bestimmter Mikroorganismen, über die Pathogenese von bestimmten Digestionsstörungen und Infektionen, über Ontogenese der primären immunologischen Reaktion und die experimentelle Onkologie (EYSSEN, 1973; GRUBER, 1974).

Außerdem wird das Steriltier als völlig krankheitsfreier Zuchtkern zur Repopulation von Tierkolonien verwendet. Morphologische und physiologische Anomalien im Vergleich mit dem konventionellen Tier beschränken sich auf Organe oder Gewebe, die in unmittelbarem Kontakt zu Mikroorganismen stehen oder zum Abwehrapparat des Organismus gehören. Die Wirkung, den Intestinaltrakt betreffend, bezieht sich unter Ausklammerung immunologischer und ernährungsphysiologischer Gesichtspunkte u. a. auf folgende Parameter:

Morphologie des Dünndarms (Wandverdünnung; reduzierte Mukosaoberfläche; hohes säulenartiges Epithel, das sich nur langsam erneuert)

Zunahme des Cäcumvolumens bei Nagetieren

Atonie der glatten Muskulatur

gestörte Resorption von Wasser und Elektrolyten

Akkumulation osmotisch aktiver Verbindungen

Toxizität des Darminhalts.
(JUHR et al., 1971; JUHR, 1972, 1974, 1981; EYSSEN, 1973; SPIEGEL, 1976)

Die Besiedlung mit einer physiologische „Normalität" erreichenden, apathogenen Flora schafft das angestrebte von pathogenen Mikroorganismen freie Versuchstier. Der heute beschrittene Weg geht auf einen Vorschlag von REYNIERS (1957) zurück. Man füttert (polyassoziiert)

keimfreie Tiere im Isolator mit Reinkulturen von apathogenen Darmbakterien konventioneller Artgenossen. Beim Hinzukommen apathogener nicht definierter Keime verlieren die Tiere zwar ihren gnotobiotischen Status, haben als spezifiziert-pathogenfreie-(SPF-) Tiere aber den Vorteil, daß sie bei Haltung im Barrierensystem auf Grund des Fehlens einer Reihe von für sie pathogenen Keimen gesünder sind. In der „Liste von Erregern zur Spezifizierung bei SPF-Versuchstieren" (Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1972) sind für die wichtigsten Versuchstierarten jene obligat oder fakultativ pathogenen Organismen aufgeführt, von denen SPF-Tiere in möglichst großem Umfang kontrolliert frei sein sollten.

Nach SPIEGEL (1976) bezieht sich die Bezeichnung SPF-Tier dabei üblicherweise nur auf solche Tiere, die über den gnotobiotischen Status gewonnen wurden. JUHR (1974) versteht dabei unter assoziiert eine permanente Besiedlung, wobei Assoziation für Keime angewandt ist, die zur autochthonen Flora zu rechnen sind, die eine positive Wirkung auf den Wirt im Sinne einer Symbiose haben und die permanent dominieren. Nach heutiger Ansicht gehören die Spezies, die zuerst als normale Flora angesehen und zur Assoziation verwendet wurden, nicht zu den physiologisch wichtigen Organismen, die zu einer Stabilisierung der Keimflora führen (NICOLAI-SCHOLTEN, 1976).

Unter Normalflora werden dabei neben der autochthonen Flora auch jene Mikroorganismen verstanden, die nur vorübergehend den Darm besiedeln und von denen zahlreiche fakultativ pathogen sind.

MOROTOMI et al. (1975) und JUHR (1976) nennen die Enge und Intimität des Kontaktes der Keime mit dem Mucosa-Epithel als Kriterium für autochthone Flora, die abhängig vom Milieu vom Magen zum Enddarm in ihrer Zusammensetzung variiert.

Mit der Entwicklung neuer Techniken zur Züchtung der höchst sauerstoffempfindlichen Bakterien konnten strikt anaerobe Darmbakterien in größerem Umfang kultiviert, isoliert und sodann ihre Bedeutung für den Wirt untersucht werden. So ist es u.a. KOOPMAN et al. (1973) gelungen, mit Hilfe einer anaeroben Kammer einige strikt anaerobe Bakterienarten zu kultivieren.

Zur Überwindung des hohen Redoxpotentials im Cäcum keimfreier Tiere, das die erfolgreiche Ansiedlung der Anaerobier verhindert, verwendet KOOPMAN (1976) einen sogenannten Satellitenkeim (eine Clostridiumspezies), der das Redoxpotential erniedrigt. NICOLAI-SCHOLTEN (1976) erreicht ein genügend tiefes Redoxpotential durch die vorbereitende Assoziation mit Lactobazillen zusammen mit E. coli.

Dennoch gibt es zur Zeit noch unüberwindliche Schwierigkeiten, Tiere mit einer standardisierten Mikroflora zu gewinnen. Es ist möglich, strikt Anaerobier zu kultivieren, aber sie zu identifizieren ist bis jetzt noch nicht befriedigend gelungen.

Verwertung von Zellulose als Maß für Mikrobielle Leistung

Alle Formen von Zellulose sind 1:4-β-Polyglucoside, die in nativen Pflanzenfasern einen Polimerisationsgrad bis zu 10 000 erreichen können (DEMEYER et al., 1973). Besitzen einige niedere Tiere (Protozoen, Mollusken Echinodermata, Nematoden, Arthropoden, Anneliden), einige Pflanzen und Algen und viele Bakterien und Pilze Enzymsysteme, die die energetische Nutzung von Zellulose ermöglichen, so sind höhere Tiere, besonders Säugetiere, zu einer direkten Zelluloseverwertung nicht imstande (GASCOIGNE und GASCOIGNE, 1960). Auf der Grundlage

symbiontischen Zusammenlebens von Mikro- und Makroorganismen haben sich bei manchen Spezies Spezialisierungen im Verdauungsapparat entwickelt, die unter Nutzung mikrobieller Aktivität Zellulose für den Makroorganismus verwertbar machen. Vorliegende Befunde beschränken sich nicht auf den Wiederkäuer (Rind, Schaf, Kamel, Zebu, Gazelle), sondern betreffen auch Elefant, Schwein, Pferd, Huhn, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und den Menschen (JUHR und HAAS, 1976).

Da Zellulose vollkommen unlöslich ist, müssen die cellulolytischen Organismen entweder extrazelluläre Enzyme und/oder an der äußeren Zellwand sich befindende Enzyme bilden (WINTER und WIEGEL, 1981). Die Enzyme in einer wachsenden Kultur können intrazellulär, periplasmatisch gebunden oder extrazellulär vorliegen (FÄHNRICH et al., 1981). Die Verdauung der Zellulose hängt an erster Stelle von der optimalen Nährstoffversorgung der Mikroorganismen und von den unterstützenden mechanischen Verdauungsfunktionen des Wirtsorganismus ab. Die Abnahme der Zellulosevergärung im Pansen nach 3-tägigem Hungern und ihre Normalisierung binnen 3-4 Tagen nach Wiederaufnahme der Fütterung (MEISKE et al., 1958) heben neben vielen anderen Befunden die Wichtigkeit der Nährstoffversorgung hervor (DEMEYER und GIESECKE, 1973). Ebenso weisen JUHR und HAAS (1976) auf die Abhängigkeit der cellulolytischen Aktivität von der nutritiven Zufuhr, d.h. vom Zellulosegehalt des Futters, hin.

Cellulolytische Aktivität als ausschließlich mikrobielle Leistung tritt nur bei besiedelten Tieren auf. JUHR (1980) weist bei konventionellen Mäusen und Ratten im Magen und Enddarm geringe, im Cäcum höhere und im Dünndarm nur Spuren cellulolytischer Aktivität nach, wohingegen bei keimfreien Tieren keine cellulolytische Aktivität auftritt. Das entspricht vorrausgegangenen Untersuchungen an besiedelten Tieren (JUHR und HAAS, 1976). Daraus ist ersichtlich, daß Maus und Ratte verglichen mit Gold-

hamster, Meerschweinchen und Kaninchen, eine geringe Aktivität gegenüber Carboxymethylcellulose zeigen und deutliche Aktivitätsunterschiede zwischen Überstandsextrakt und Sedimentextrakt zu beobachten sind.

Es ist von Interesse, inwieweit Rohfaser als Energiequelle genutzt werden kann. BOND und LEVITT (1976) haben gezeigt, daß Milchsäure vom menschlichen Colon absorbiert werden kann, und CONRAD et al. (1958) zeigten, daß C^{14} von markierter Sojabohnen-Zellulose, gefüttert an Ratten, sowohl im ausgeatmetem CO_2, als auch in Knochen und Urin gefunden wurde (NYMAN und ASP, 1982).

Dabei weisen NYMAN und ASP (1982), BERGNER et al. (1975), BERGNER (1982) auf eine Hemmung der Proteinverdauung bei Ratte und Schwein durch rohfaserreiches Futter hin.

Ebenso sind flüchtige Fettsäuren als Endprodukte des mikrobiellen Energiestoffwechsels nicht nur Initiatoren für mikrobielle Aktivität, sondern haben auch Bedeutung für den Energiehaushalt des Wirtes (JUHR, 1979). Im Dickdarm des Schweines kann Rohfaser in beträchtlicher Menge verdaut werden. Die im Rahmen der Dickdarmgärung gebildeten Fettsäuren werden resorbiert und vom Wirtstier energetisch genutzt (BERGNER, 1982).

Die Tabelle 1 gibt den Anteil der cäcalen Fermentation am Energiehaushalt verschiedener Tierarten an. Zellulosespaltung macht einen großen Anteil dieser mikrobiellen Fermentation aus, die der Wirt nutzt.

Tabelle 1

Energiegewinnung aus der Fermentation im Cäcum bei verschiedenen Tierarten (Anteil in Prozent) PARKER (1976)

Schwein	3 %
Kaninchen	4-12 %
	27 %
	40 %
Ratte	9 %
Porcupine	16 %
Biber	19 %
Schaf	9 %
Mensch	2 %

Tabelle 2 Verdaulichkeit von Rohfaser, Cellulose und Hemicellulosen bei verschiedenen Spezies (in %)

Spezies	Rohfaserquelle	Rohfaser	Cellulose	Hemicellulosen	Quelle
Mensch	All-Bran	5	6	--	(HOPPERT and CLARK, 1945)
	Kohl	14	42	--	
	Apfel	71	57	--	
Mensch	Gemischte Diät	--	71	67	(HUMMEL et al., 1943)
Mensch	Standardisierte Volldiät mit 8.5 g/Tag Cellulose-Aufnahme	--	43	--	(MILTON-THOMPSON and LEWIS, 1971)
Mensch	Keine Früchte oder Gemüse außer Tomaten	--	15-55	94-98	(SOUTHGATE and DURNIN, 1970)
	Früchte, Gemüse und Vollkornbrot	--	15-44	72-85	
	Früchte, Gemüse und Vollkornbrot (hoher Gehalt)	--	22	83	
Mensch	Agar-Agar	--	--	59	(WILLIAMS and OLMSTED, 1936)
	Celluflour	--	11	--	
Mensch	Verschiedene Weizenprodukte	7-28	--	--	(CRAMPTON et al., 1951)
Ratte	Versch. Weizenprodukte	10-11	--	--	(CRAMPTON et al., 1951)
Meerschweinchen		36-51	--	--	
Schwein		23-15	--	--	
Kaninchen	--	--	16	25	(FONNESBECK et al., 1974)
Schwein	--	--	30	46	
Ratte	--	--	21	26	
Huhn	--	--	10	4	
Kaninchen	Grünmehl	16	--	--	(SLADE and HINTZ,1969)
Meerschweinchen		38	--	--	
Rhesusaffe	extrudierte Diät	47	--	--	(KNAPKA and MORIN,1979)
	gebackene Diät	39	--	--	
Ratte	Grünmehl	--	21	47	(KEYS et al., 1969)
Schwein		--	40	42	
Ratte	Trespe	--	1	11	
Schwein		--	39	47	
Ratte	Knaulgras	--	2	6	
Schwein		--	44	47	
Pferd	100 % Grünmehl	--	45	73	(HINTZ et al., 1971)
	50 % Grünmehl 50 % Getreide	--	54	73	
	20 % Grünmehl 80 % Getreide	--	63	81	

Tabelle 2 gibt die Verdaulichkeit von Rohfaser, Cellulose und Hemicellulose bei verschiedenen Spezies wieder (KRUMBACHER, 1981).

Dabei wird deutlich, daß die Verdaulichkeit der Cellulose unmittelbar mit ihrer Struktur und der Partikelgröße verknüpft ist (DEHORITY, 1961).

So zeigen auch Bilanzuntersuchungen zur Zelluloseverwertung bei Ratten unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der Methode und der eingesetzten Zellulose. Es werden Angaben von 20 - 50 % Zelluloseverdaulichkeit gemacht (JUHR und HAAS, 1976; JUHR 1975).

Tabelle 3 gibt einen Überblick der aus Faeces und Verdauungstrakt isolierten zellulosespaltenden Keime verschiedener Säugetierspezies.

Es wurden auch bei Hirsch, Reh und Gemse, Flußpferd, Zebu, Kamel, Gazelle, Antilope und Elefant zellulosespaltende Mikroorganismen nachgewiesen, aber nicht näher charakterisiert.

Anhand der Fermentationsprodukte, der verdauten Kohlehydrate, der Morphologie und von Zellwandbestandteilen wurden besonders bei den Gattungen Ruminococcus und Bacteroides diverse Stämme unterschieden.

Während die Pansenbakterien im wesentlichen Succinat, Acetat, Formiat und Äthanol bilden (GIESECKE, 1973), ist das hauptsächliche Fermentationsprodukt der fünf isolierten Kokkenstämme vom Cäcum des Meerschweinchens Lactat (DEHORITY, 1977).

Die cellulolytischen Kokken aus dem Kaninchenblinddarm (HALL, 1952) bilden zwar Acetat, Succinat und Äthanol, fermentieren aber nur Zellulose und Cellobiose.

So wurde aus dem Rattenblinddarm B. succinogenes isoliert (MONTGOMERY und MACY, 1982), der sich im Vitaminbedarf und in der Zusammensetzung der DNA-Basen von den Pansenstämmen unterscheidet.

Die Bacteroides-Spezies, die aus menschlichen Faeces isoliert wurden, ist gut charakterisiert worden und wurde nicht als B. succinogenes zugehörig betrachtet (BETIAN et al., 1977). Vom Cäcum konventioneller Mäuse wurden 28 Bacteroides-Spezies isoliert (TANNOCK, 1977), aber es konnte keine Zelluloseverdauung nachgewiesen werden.

Über die Keimzahl cellulolytischer Mikroorganismen gibt es in der Literatur wenig Angaben. Es können nur Aussagen in Abhängigkeit von der jeweiligen Diät gemacht werden, da der Keimgehalt je nach Zellulosegehalt und -quelle variiert.

Beim Kaninchen treten danach 5 - 720 x 10^5 cellulolytische Kokken/g Cäcuminhalt auf bei unterschiedlichen Diäten (KAMETAKA, 1973).

Im Rattenblinddarm wurden 0,5x10^8 - 12,2x10^8 cellulolytische Keime/g Cäcuminhalt gefunden (MACY et al., 1982) und die Anzahl der Bacteroides-Spezies in menschlichen Faeces wird mit 2,4x10^8 Keimen/g angegeben (BETIAN et al., 1977; BRYANT, 1978).

Auf Grund ihres ausschließlich anaeroben Wachstums und ihres spezifischen Nährstoffbedarfs war eine erfolgreiche Züchtung und Isolierung erst unter Verbesserung der anaeroben Kulturtechnik und Einsatz adäquater Nährmedien möglich. Die Technik, Medien und Kulturen unter sauerstofffreien Bedingungen zu halten, basierten auf der von HUNGATE (1944, 1966, 1969) beschriebenen Methode.

Tabelle 3

Zellulosespaltende Keime isoliert von Faeces und Darminhalt verschiedener Spezies

Spezies	Entnahme	Keim	Quelle
Rind	Pansen	Ruminococcus flavefaciens	SIJPSTEIJN, 1951
		Ruminococcus albus	HUNGATE, 1957
		Bacteroides succinogenes	HUNGATE, 1950
		Butyrivibrio fibrisolvens	BRYANT and SMALL, 1956
		Clostridium lochhedii	HUNGATE, 1957
		Clostridium longisporum	HUNGATE, 1957
		Cillobacterium cellulosovens	BRXANT et al., 1958
Schaf	Pansen	Ruminococcus flavefaciens	SIJPSTEIJN, 1951
		Butyrivibrio fibrisolvens	SHANE et al., 1969
		cellulolytische Sporenbildner nicht eindeutig zugeordnet	SHANE et al., 1969
		Ruminococcus-Stämme	VAN GLYSWYK, 1968
Schwein	Dickdarm (Cäcum, Colon, Faeces)	Bacteroides succinogenes Ruminococcus flavefaciens	VAREL et al., 1984

Spezies	Entnahme	Keim	Quelle
Pferd	Caecum und Colon ascendens	Bacteroides sp. Bacillus cellulosae dissolvens	DAVIES, 1964
Kaninchen	Cäcum	Ruminococcus-Stämme	HALL, 1952
	Faeces	Butyrivibrio fibrisolvens	ROSEBURY, 1962
		Ruminococcus-Stämme	SMITH, 1965
Meer-schweinchen	Cäcum	Ruminococcus sp.	DEHORITY, 1977
		Ruminococcus flavefaciens	JUHR und HAAS, 1976
Ratte	Cäcum	Bacteroides succinogenes	MACY et al., 1982
		Ruminococcus flavefaciens	MACY et al., 1982
Mensch	Faeces	Bacteroides-Stämme	BETIAN et al., 1977
		Bacillus cellulosae dis-solvens	KHOUVINE, 1923

Von besonderer Wichtigkeit ist die detaillierte Erforschung des Nahrungsbedarfs der Cellulolyten, um alle zellulosespaltenden Keime erfassen und isolieren zu können. Dabei gehen DEHORITY und GRUBB (1976) in zwei Schritten vor:

1. Zufällige Isolierung vom nichtselektiven Medium und sorgfältige Trennung der einzelnen Stämme.
2. Überimpfen auf Selektivmedium mit nur einer Energiequelle.

Bei Zellulose als einziger Energiequelle werden nur die Kolonien bewertet, die von einer Klarzone umgeben sind. Als Basalmedium kommen dabei das „rumen-fluid-medium" (RFM) (HALL, 1952; BRYANT und BURKEY, 1953; CALDWELL und BRYANT, 1966; HOBSON und MANN, 1971; DAVIES, 1971; BRYANT, 1973; DEHORITY und GRUBB, 1976; DEHORITY, 1977; BETIAN et al., 1977) und ein Medium ohne Pansensaft (PY-Medium oder Medium 10) zur Anwendung, wobei Pansensaft durch Yeast-Extrakt, Trypticase, Hemin und einer Mischung aus leicht flüchtigen Fettsäuren (VFA) und teilweise Pepton ersetzt wird (LEATHERWOOD, 1965; IFKOVITS et al., 1965; DEHORITY, 1961; CALDWELL und BRYANT, 1966; TANNOCK, 1976; JUHR und HAAS, 1979; GROLEAU und FORSBERG, 1981; MACY et al., 1982; MONTGOMERY und MACY, 1982).

Die standardisierten Ingredientien im PY-Medium sind ein Vorteil gegenüber dem RF-Medium. Jedoch enthält der Pansensaft offensichtlich unbekannte Wachstumsfaktoren, die von manchen Bakterien benötigt werden (CALDWELL und BRYANT, 1966).

Das am häufigsten verwendete Medium zur Erhaltung von Reinkulturen ist das RGCA-Medium (rumen-glucose-cellobiose-agar), das in Roll-Tubes verwendet wird (BRYANT und BURKEY, 1953).

Zur Isolierung von cellulolytischen Keimen wurden unterschiedliche Substrate benutzt, z. B. native Zellulose (DEHORITY und GRUBB, 1976), Zellulosepulver (HOBSON und MANN, 1971), gequollene Zellulose (WALSETH, 1952), Filterpapier (HALL, 1952; MANN, 1968) und Carboxymethylcellulose (LEATHERWOOD, 1965). Der Nahrungsbedarf der verschiedenen Cellulolyten ist durchaus nicht identisch, und so unterscheidet sich die Menge und die Art der Keime, die abhängig vom Nahrungsangebot im Medium beobachtet werden können. Da die cellulolytischen Keime streng anaerob sind, muß unter Sauerstoffausschluß gearbeitet werden (Gas-Pak-System, Hungate-Technik, Glove-Box-Methode). Die Nährmedien werden präreduziert.

Cellulase-Aktivität

Die Ermittlung mikrobieller Aktivität im Intestinaltrakt ist Voraussetzung für die definierte Besiedlung im Sinne einer symbiotischen Assoziation. Die Cellulase-Aktivität als ausschließlich mikrobielle Leistung ist dabei von besonderem Interesse. JUHR und HAAS (1976) legen Befunde cellulolytischer Aktivität im Cäcuminhalt bei Maus, Ratte, Goldhamster, Meerschweinchen und Kaninchen vor.

Sie zeigen bei enzymatischer, manometrischer und kultureller Ermittlung im Prinzip gleiche Ergebnisse, nämlich eine Aktivitätssteigerung in der Reihenfolge Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen.

In allen bisher untersuchten Organismen ist „das cellulolytische System" eine Mischung aus mehreren Enzymen,

die bei der Hydrolyse der Zellulose zusammenwirken (WINTER und WIEGEL, 1981).

Die Einzelenzyme zeigen bei definiertem Zusammengeben im kinetischen Test synergistische Wirkung. Es ist noch nachzuweisen, ob der Synergismus auch beim Celluloseabbau in-vivo eine Rolle spielt (WOOD, 1968; HOLM, 1978; FÄHNRICH et al., 1981).

Die meisten der cellulolytischen Mikroorganismen produzieren die zum Cellulase-System gehörenden Enzyme dann, wenn zellulosehaltiges Material als Kohlenstoffquelle angeboten wird (MANDEL und WEBER, 1969).

Dabei stellt BRANDON (1979) eine Hemmung der Zellulosespaltung bei Anwesenheit von größeren Mengen Cellobiose fest und vermutet einen Feed-Back-Mechanismus, da sie in geringerer Konzentration induzierend wirkt.

Auch hohe Stärke- und Zuckergehalte in den Rationen der Versuchstiere wirken sich nachteilig auf die Verwertung der Zellulose aus (JUHR, 1979).

Die funktionelle Einheit des Cellulase-Systems bilden Endoglucanase oder C_x-Komponente, die reaktive Zellulose hydrolysieren kann (gequollene Zellulose, lösliche Derivate), Exoglucanase oder C_1-Komponente, die zusammen mit C_x kristalline Zellulose spalten kann, eine Glucosidase, die Cellobiose spaltet, die von den ersten beiden Komponenten gebildet wurde, und Cellobiase, die die Spaltung der Cellobiose in homogener Reaktion katalysiert (FÄHNRICH et al., 1981; MANDELS und REESE, 1964; LEATHERWOOD, 1965; WOOD, 1968; GROLEAU und FORSBERG, 1981).

Die Cellulasen der meisten Bakterien scheinen zellgebunden (VAHERI et al., 1979; GROLEAU und FORSBERG, 1981; MANDEL und WEBER, 1969), so wandert z. B. Bacteroides succinogenes im Cellulose-Agar durch das

Medium zum substrathaltigen Teil (HUNGATE, 1947; MONTGOMERY und MACY, 1981), während Pilze ihre Cellulasen nach Beendigung der Wachstumsphase (VAHERI et al., 1979) ins Medium ausscheiden (MANDEL und WEBER, 1969).

VAHERI et al. (1979) nehmen an, daß die Exoglucanasen, die die Hydrolyse von hochkristalliner Zellulose einleiten, enger an die Zelle gebunden sind als die Endoglucanasen, so daß der direkte Kontakt zwischen Zelle und Zellulose notwendig ist, um die Hydrolyse zu beginnen.

Die Feststellung cellulolytischer Aktivität im Überstandsextrakt bzw. Kulturfiltrat zeigt aber, daß „Zellulasen" frei im Darmkanal auftreten und wirksam sein können und nicht nur als Oberflächenenzyme zu betrachten sind (JUHR und HAAS, 1976). Das Vorkommen extrazellulärer Cellulasen wird jedoch auch als eine Folge von Zellautolyse und somit als Artefakt interpretiert (GROLEAU und FORSBERG, 1981; FÄHNRICH et al., 1981;). Kürzlich beschrieben LAMED et al. (1984) diskrete Zelloberflächenorganellen und bezeichnen diese als " Cellulosome", als Ursprung von Endo- und Exocellulasen.
Die Bestimmung der cellulolytischen Aktivität erfolgt nach verschiedenen analytischen Methoden. Diese Methoden differieren merklich in ihrer Empfindlichkeit und darin, welche Cellulase-Komponenten gemessen werden. Das ist abhängig von dem gebrauchten Substrat, dem gemessenen Kriterium, der Dauer und den Bedingungen des Versuchs.

Als Substrat werden hauptsächlich Carboxymethylcellulose, gequollene Zellulose und Filterpapier verwendet. Bestimmt werden die durch Hydrolyse entstandenen reduzierenden Substanzen unter Anwendung der Dinitrosalicylsäureprobe (MILLER et al., 1960; SUMNER und SISLER, 1944). Die Aktivität wird in g/ml freigesetzter reduzierter Substanz im Zelluloseextrakt bzw. mU/ml Extrakt bei Vergleich der Hydrolyse mit einer kommerziellen Zellulase als Standard ausgedrückt (LEATHERWOOD, 1965; MANDEL und WEBER, 1969; JUHR und HAAS, 1976; VAHERI et al., 1979; GROLEAU und FORSBERG, 1981).

WOOD (1968) bestimmt die reduzierenden Substanzen mittels des Nelson-Reagenz, und HOLM (1977) benutzt ein „ferricyanid-molybdoarsenic-acid"-Reagenz.

Weitere Möglichkeiten der Aktivitätsbestimmung bestehen in der Methode der radialen Diffusion in substrathaltigem Agar (SCHUMACHER und SCHILL, 1972), wobei die Enzymaktivität der Proben durch den Vergleich mit den mitgeführten Enzymstandardlösungen ermittelt wird (JUHR, 1980), der Messung des Gewichtsverlustes unlöslicher Substrate (VAHERI et al., 1979), der Viskositätsänderung löslicher Zellulosederivate (LEATHERWOOD, 1965; GROLEAU und FORSBERG, 1981), und dem S-factor nativer Baumwollfasern, wobei die Zunahme des Gewichtes durch Quellung in linearer Abhängigkeit zur Enzymkonzentration steht (WOOD, 1968).

JUHR und HAAS (1976) führen auf der Grundlage der Methode von MC BEE (1953) eine manometrische Ermittlung der Enzymaktivität im Blinddarminhalt von Nagern mit CMC als Substrat durch.

Durch die Verabreichung von cellulolytischen Enzymen im Futter konnten bei Mäusen bessere Gewichtszunahmen und höhere Celluloseverwertung festgestellt werden (JUHR, 1979).

Die Bedeutung für den Energiestoffwechsel liegt in der Bildung von flüchtigen niederen Fettsäuren aus der verabreichten Cellulose in der Diät. Nach YANG et al. (1972) werden 5 % der mit der Nahrung aufgenommenen Energie im Cäcum

zu flüchtigen Fettsäuren umgewandelt, die resorbiert werden und dem Wirt zur Verfügung stehen.

JUHR und HILLER (1979) weisen bei Ratten einen Anstieg der Keimzahl im Blinddarm mit dem Gehalt an Cellulose nach. Bei steigendem Hostalengehalt - mikrobiell nicht verwendbarer Ballaststoff - sinkt Keimzahl und Keimprotein ab. Unterschiede im Wachstum zeigen sich bei konventionellen und keimfreien Tieren nicht. Nur beim monoassoziierten Tier ist der positive Effekt der Besiedlung zu zeigen.

In Versuchen mit Meerschweinchen (8 - 30 % Cellulosegehalt im Futter) wurde - anders als bei der Ratte - eine unterschiedliche Körpergewichtsentwicklung registriert. Der fäkale Keimgehalt korreliert positiv mit dem erzielten Wachstum der Tiere. Die cellulolytische Aktivität in den verschiedenen Darmabschnitten steigt bis zum Cellulosegehalt im Futter von 20 % und nimmt darüber ab.

Der Einfluß der Rohfaser in der Diät in Abhängigkeit von der mikrobiellen Besiedlung auf den Verdauungstrakt ist an folgenden Parametern beobachtet worden:
Länge und Gewicht der Darmabschnitte, Zottenlänge und Zellerneuerung, Passagezeit des Darminhalts und Wassergehalt im Enddarminhalt.

Untersuchungen von KOMAI und KIMURA (1980) und SACQUET et al. (1982) an Ratte und Maus zeigen bei keimfreien Tieren bei Zunahme des Cellulosegehalts im Futter eine Abnahme des Dünndarmgewichts und ein Absinken des Cäcumgewichts. Ebenso hat die Verabreichung von anaerober Flora isoliert aus SPF-Tieren einen reduzierenden Effekt auf das relative Cäcumgewicht (KOOPMAN et al., 1982; MOROTOMI et al., 1975). Bei konventionellen Tieren differieren die Angaben. Während KOMAI und KIMURA (1980) eine Abnahme des Cäcumgewichts auch bei konventionellen Tieren feststellen, zeigen sich bei TAKEHISA et al. (1979) keine Änderungen in Gewicht und

Länge von Dünndarm und Cäcum, während SACQUET et al. (1982) bei Pektinfütterung sogar eine Erhöhung des Cäcumgewichts nachweist.

Die Dünndarmzotten sind beim keimfreien Tier länger als beim konventionellen Tier (EYSSEN, 1973). Mit Erhöhung des Cellulosegehalts im Futter nimmt die Zottenlänge auch beim keimfreien Tier ab und nähert sich der der konventionellen Tiere (KOMAI und KIMURA, 1980). Damit verbunden ist eine Erhöhung der Zellabschilferung und der Mitoserate der Epithelzellen der Schleimhaut keimfreier Tiere.

Die Lebenszeit der Epithelzellen sinkt um durchschnittlich 44 Stunden bei 10 % Zellulose im Futter. Bei konventionellen Tieren ist kein Einfluß des Cellulosegehalts festzustellen. Es wird angenommen, daß die Verdauung der Cellulose und die Anpassung der Darmflora an den Cellulosegehalt dabei eine wesentliche Rolle spielen (KOMAI und KIMURA, 1980, 1981; KOMAI et al., 1982). MESLIN et al. (1981) weisen einen stimulierenden Effekt von Lactose in der Diät auf die Zellerneuerung sowohl bei keimfreien als auch bei konventionellen Ratten nach.

Durch Assoziation keimfreier Mäuse mit Keimen von SPF-Tieren erreichen SAVAGE et al. (1981) eine Beschleunigung der Migrationsrate der Epithelzellen von den Lieberkühn'schen Krypten zu den Villi von 115 Stunden bei keimfreien Mäusen auf 53 Stunden bei assoziierten. Monoassoziationen mit Lactobacillus sp. und Torulopsis pintolopesii haben keinen Effekt. Die Wirkung des steigenden Cellulosegehalts in den Diäten liegt weiterhin in der Erhöhung der Passagegeschwindigkeit (TAKEHISA, 1979; KOMAI und KIMURA, 1981; BERGNER, 1982; FLEMMING und LEE, 1983; RIOTTOT et al., 1984) durch Verbesserung der osmotischen Verhältnisse im Dickdarm und Erhöhung der Colon-Motilität.

Zur Feststellung der Wirkung von isolierten Keimspezies auf den Makroorganismus unter dem Gesichtspunkt morphologischer und physiologischer Normalität müssen diese Spezies definiert an keimfreie Tiere assoziiert werden.

Die erfolgreiche Übertragung eines Cellulomonas Cellulase-Genes auf E. coli (WHITTLE et. al., 1982) zeigt erwähnenswerte biotechnologische Möglichkeiten auf.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methode

1. Versuchstiere und Haltung

1.1. Ermittlung zellulosespaltender Keime bei konventionellen Ratten in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters (Fütterungsversuch).

Für den Fütterungsversuch mit Futter verschiedenen Zellulosegehaltes wurden 50 konventionelle männliche Ratten - Han:WIST (Wistar) - verwendet. 25 stammten aus dem Auszuchtbestand des Instituts für Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten der Freien Universität Berlin (Versuchsreihe A) und 25 aus der zentralen Versuchstieranlage des Bundesgesundheitsamtes (Versuchsreihe B).

Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen Typ III auf Weichholzgranulat. Futter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.
Die Raumtemperatur betrug 22 ± 1°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 ± 10%.
Das Lichtprogramm war auf einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden eingestellt.

1.2. Besiedlung (Assoziation) keimfreier Ratten mit zellulosespaltenden Keimen, isoliert von konventionellen Ratten (Assoziationsversuch).

Es wurden 34 keimfreie Ratten (Han:WIST) der Keimfrei-Kolonie des Instituts für Versuchstierkunde (Herkunft: Zentralinstitut für Versuchstierkunde Hannover 1978) und 16 konventionelle Ratten aus den Zentralen Tierlaboratorien Berlin verwendet. Die Haltung der keimfreien Tiere erfolgte in Isolatoren vom Trexler-Typ (Fa. Metall und Plastik, Radolfzell) entsprechend dem Standard Gnoto-

biotechnik (HEINE, 1968). Die Haltung der konventionellen Tiere erfolgte wie unter 1.1. beschrieben. Es kam Futter mit unterschiedlichem Zellulosegehalt zur Anwendung. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die keimfreien Tiere erhielten autoclaviertes Futter (130°, 5 min). An den drei letzten Versuchstagen wurde das Futter zur Ermöglichung einer Zellulosebilanz rationiert.

1.3. Verwertung von C^{14}-markierter Zellulose (Stoffwechselversuch)

Es kamen 5 konventionelle, 5 assoziierte und 5 keimfreie männliche Ratten (Han:WIST) des Instituts für Versuchstierkunde in den Versuch. Die Haltung der Tiere erfolgte für konventionelle Tiere wie unter 1.1. beschrieben, die der keimfreien und assoziierten Tiere in Isolatoren wie unter 1.2. beschrieben. Nach Verabreichung der C^{14}-Zellulose erfolgte die weitere Haltung einzeln in Stoffwechselkäfigen, die mit einem PVC-Kasten ummantelt waren(s. Versuchsbeschreibung 6.).

2. Fütterungsversuch

In diesem Versuch sollte der Einfluß unterschiedlicher Zellulosegehalte im Futter auf die Anzahl cellulolytischer Keime und die Cellulaseaktivität im Blinddarminhalt untersucht werden.
Zwei Versuchsreihen (A+B) mit jeweils 25 Tieren wurden durchgeführt. Die Tiere wurden in einer zufälligen Verteilung in jeweils 5 Gruppen zu 5 Tieren aufgeteilt.
Jede Gruppe erhielt dabei ein Futter mit anderem Zellulosegehalt, wobei der Gruppe I das Futter I, der Gruppe II das Futter II, ..., der Gruppe V das Futter V zugeordnet wurde. Die Versuchsdauer betrug 6 Wochen. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 4 Wochen alt.
Aus der Versuchsreihe A wurde nach jeweils einer Woche Versuchsdauer aus jeder Gruppe ein Tier entnommen, durch Chloroform getötet und Blinddarminhalt unter Luftabschluß und aseptisch zur Keimzahlbestimmung gewonnen und in präreduzierte Thioglykolatbrühe verbracht.
In der Versuchsreihe B wurden wöchentlich von allen Tieren Kotproben gewonnen (fixieren der Tiere bis zum Kotabsatz) und zur Keimzahlbestimmung in präreduzierte Thioglykolatbrühe verbracht.

2.1. Zusammensetzung des Futters

Futter	I	II	III
Sojamin 90 (%)	20	20	20
Maisstärke (%)	66,75	61,75	56,75
Sojaöl (%)	5,0	5,0	5,0
Zellulosepulver (%)	- - -	5,0	10,0
Vit. Mischung (%)	3,0	3,0	3,0
Mineral. Mischung (%)	5,0	5,0	5,0
DL-Methionin (%)	0,25	0,25	0,25

Futter IV Altromin 1324 fortified
Rohfasergehalt 6,0 % entspricht 5% Zellulose
Futter V Kellogg's Bran Buds®
Rohfasergehalt 33 % entspricht 30% Zellulose

Futter I enthält also keine Zellulose.
Futter II und III enthalten 5 und 10% synthetische Zellulose.
Futter IV und V enthalten 5 und 30% natürliche Zellulose.
Futter I - III wurden als Pulvermischungen verabreicht.
Futter IV und V lagen als Pellets vor.

2.2. Keimzahlbestimmung

Um eine direkte Beziehung zwischen der aufgenommenen Zellulosemenge und der Anzahl cellulolytischer Keime zu bestimmen, war es nötig, das Wachstum anderer Keime auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde mit einem Selektivnährboden gearbeitet, der als einzige Energiequelle Zellulose als substratspezifisches selektives Kohlenhydrat enthielt (JUHR 1979).

Es standen folgende Substrate zur Diskussion:

Substrat
1. Filterpapier (MANN , 1968; HALL, 1952)
2. Zellulosepulver (HOBSON u. MANN, 1971)
3. Gequollene Zellulose (WALSETH, 1952)
4. Carboxymethylcellulose (LEATHERWOOD, 1965)
5. native Zellulose (DEHORITY u. GRUBB, 1976)
(Holz, Grünmehl, Maiskolbenmehl)
6. Cellulose-Azur (SMITH, 1977)

Diese Substrate wurden dem mit Pansensaft oder Cäcuminhalt angereichertem Basalmedium zugesetzt oder wurden als präfermentierte Nährböden mit Pansensaft (DEHORITY u. GRUBB, 1976) eingesetzt.
Auch synthetische komplette Nährböden (LEATHERWOOD, 1965) wurden verwendet.
In vielen Vorversuchen wurde die Herstellung der Substrate verschiedener Quellen und die Bereitung des Basalmediums erprobt. Zur Ermittlung des besten Züchtungserfolges wurden Nährböden mit verschiedenen Substraten, Basalmedien und Anreicherungen in verschiedenen Kombinationen hergestellt

und gleichzeitig mit Blinddarminhalt (von Ratten, die im Rahmen anderer Versuche getötet worden waren) beimpft. Diese Versuche ergaben das jeweils beste Kulturergebnis auf dem für die weiteren Versuche verwendeten Nährboden folgender Zusammensetzung:

Basalmedium für 100 ml Nährboden

Caseinhydrolysat	0,5	g
Hefe-Extrakt	0,12	g
Cystein HCl	0,05	g
Na_2CO_3	0,4	g
Resazurin 0,1%	0,1	ml
Minerallsg. A	15,0	ml
Minerallsg. B	15,0	ml
zentrifugierter Pansensaft	20	ml
dest. Wasser	50	ml

2 % Agar (HOBSON u. MANN, 1971)

Minerallsg. A (g/l):	KH_2PO_4	3,0 g
	$(NH_4)_2SO_4$	6,0 g
	NaCl	6,0 g
	$MgSO_4$	0,6 g
	$CaCl_2$	0,6 g
Minerallsg. B (g/l):	K_2HPO_4	3,0 g

In Versuchsreihe A wurde als Substrat 1%ige Carboxymethylcellulose gewählt.
In Versuchsreihe B wurde Cellulose-Azur (Calbiochem) eingesetzt.

Die Technik , Medien und Kulturen unter sauerstofffreien Bedingungen zu bereiten, basiert auf der von HUNGATE entwickelten und nach ihm benannten Methode (HUNGATE, 1944. 1950, 1960, 1969).
Pansensaft wurde gewonnen, indem Panseninhalt durch Gaze filtriert und bei 10 000 U/min 15 min zentrifugiert wurde. Cystein HCl und $NaCO_3$ wurden in konzentrierter Lösung steril filtriert und zu der Hauptmenge Medium gefüllt, das bei 121°C für 20 min sterilisiert worden war. Es wurde unter CO_2-Begasung gearbeitet (gereinigtes CO_2, Messer-Griesheim, Nachreinigung durch Oxisorb).
Sämtliche weiteren Schritte erfolgten unter ständiger CO_2-Begasung, um einen Kontakt des Blinddarminhaltes mit Luftsauerstoff zu vermeiden.
Cystein HCl diente als Reduktionsmittel, Resazurin als Redox-Indikator. Der Sauerstoffgehalt im Nährboden sollte < 1ppm sein und wurde mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Orion Modell 97-08) überprüft.
Die Messung des Redoxpotentials erfolgte mit einer Platinelektrode (Ionalyzer 0107694, Orion Research Incorporated) des Knick ph-Meters.

Versuchsreihe A - Keimzahl im Blinddarminhalt -
- Oberflächenkultur in Rollröhrchen -

Zur Keimzahlbestimmung wurde mit der Probe aus dem Blinddarminhalt jedes Tieres eine Verdünnungsreihe in präreduzierter Thioglykolatbrühe hergestellt. 1g Blinddarminhalt kam auf 9 ml Verdünnungsmittel. Es wurde bis zur Stufe 10^{-9} verdünnt, wobei 1 ml der vorangegangenen Stufe übertragen wurde auf 9 ml Verdünnungsmittel. Verwendet wurden dann die Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-9}.
Zur Bereitung der Roll-Tubes wurden für jede Verdünnungsstufe drei Reagenzgläser mit 5 ml Selektivmedium beschickt, begast und mit Gummistopfen verschlossen. Anschließend wurden die gefüllten Reagenzgläser im Wasserbad auf 50° C gehalten und mit 1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe beimpft. Nach guter Durchmischung wurden durch Drehen im

kalten Wasser Roll-Tubes hergestellt. Die beimpften Röhrchen kamen dann senkrecht in den Brutschrank und wurden bei 37°C eine Woche bebrütet. Daneben wurden bei jedem Versuchsteil drei unbeimpfte Röhrchen als Kontrolle mitbebrütet.
Dieser Vorgang wurde jede Woche bis Ende der Versuchsreihe wiederholt.
Nach einer Woche Bebrütungsdauer wurden die durch zellulosespaltende Keime gebildeten Kolonien gezählt, soweit sie sich einzeln unterscheiden ließen.
Dazu wurden die Röhrchen mit 1%igem N-Cethyl-NNN-trimethylammoniumbromid überschichtet (HANKIN u. ANAGNOSTAKIS, 1977). Dabei bilden sich um zellulosespaltende Kolonien Klarzonen.
Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Versuchsreihe B (Most Probable Number) und relevanten Publikationen (MACY et al., 1982) wird für die Keimzahl keine logarithmische Transformation durchgeführt, entsprechend der Empfehlung von BEST (1970) für Einzelproben.

Versuchsreihe B - Keimzahl in den Faeces -
- Flüssigkultur -

Die Keimzahlbestimmung in den Faeces wurde mit der MPN-(Most Probable Number) Methode durchgeführt, wie auch in der Untersuchung von zellulosespaltenden Keimen bei Schweinen angewandt (VAREL et al., 1984). Zum Basalmedium ohne Agar wurde als Substrat Cellulose-Azur (Calbiochem) in einer Menge von 0,2% zugesetzt.
Bei Spaltung von Zellulose wird der gebundene Farbstoff frei und diffundiert in den Nährboden und färbt ihn einheitlich blau. Diese Methode ist u. a. für die Bestimmung cellulolytischer Pilze (SMITH, 1977), bzw. intestinaler Bakterien (KRENILOVA et al., 1977) eingesetzt worden.

Die Nährbodenherstellung unter Sauerstoffausschluß, die Probenbearbeitung und die Verdünnungsreihen wurden wie in der Versuchsreihe A durchgeführt.
Ausgehend von 1 g frischen Faeces wurde in 9 ml präreduzierter Thioglykolatbrühe mit einem Ultra-Turrax für 30 Sekunden homogenisiert und anschließend bis 10^{-10} stufenweise weiter verdünnt.
Von den Verdünnungsreihen 10^{-8} bis 10^{-10} wurden jeweils 3 Röhrchen mit 1 ml beimpft, begast, mit flüssigem Paraffin überschichtet und mit Neoprenstopfen verschlossen.
Während der Dauer der Bebrütung von einer Woche bei 37 ^{o} C wurden die Röhrchen zur Verhinderung der Sedimentation der Zellulose täglich durch schnelles Drehen zwischen den Handflächen durchmischt.
Nach einwöchiger Bebrütung wurden die Kulturröhrchen beurteilt. Homogene Blaufärbung diente als Kriterium für die Anwesenheit von cellulolytischen Keimen. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Rechenprogramms für die MPN (MAC DONELL et al., 1984) auf einem HP 85 Rechner ermittelt.

2.3. Cellulaseaktivität im Blinddarminhalt

Der Blinddarminhalt jedes Tieres aus der Versuchsreihe A wurde auf seine Cellulaseaktivität untersucht. Sie wurde als radiale Diffusion in Celluloseagar gemessen (Zusammensetzung siehe Anhang). Die Enzymaktivität der Proben wurde anhand des Diffusionsdurchmessers berechnet unter Bezug auf drei auf jeder Probenplatte mitgeführte Standardkonzentrationen 2, 20, 200 mU (Cellulase Merck Nr. 2312; 10 mg/ml entsprechen 20 mU/mg).
Nach SCHUMACHER und SCHILL (1972) besteht zwischen dem Logarithmus der Enzymaktivität und dem Diffusionsdurchmesser eine lineare Beziehung.
Auf einem HP (Hewlett-Packard) 32E Rechner wurde für den log der Aktivität des Standards der jeweilige Diffusionsdurchmesser zur Errechnung der Regressionsgeraden eingegeben und auf dieser Basis für die Diffusionsdurchmesser der Proben die Aktivität als linearer Schätzwert errechnet.

Abbildung 1

Beispiel einer Eichkurve für Cellulase

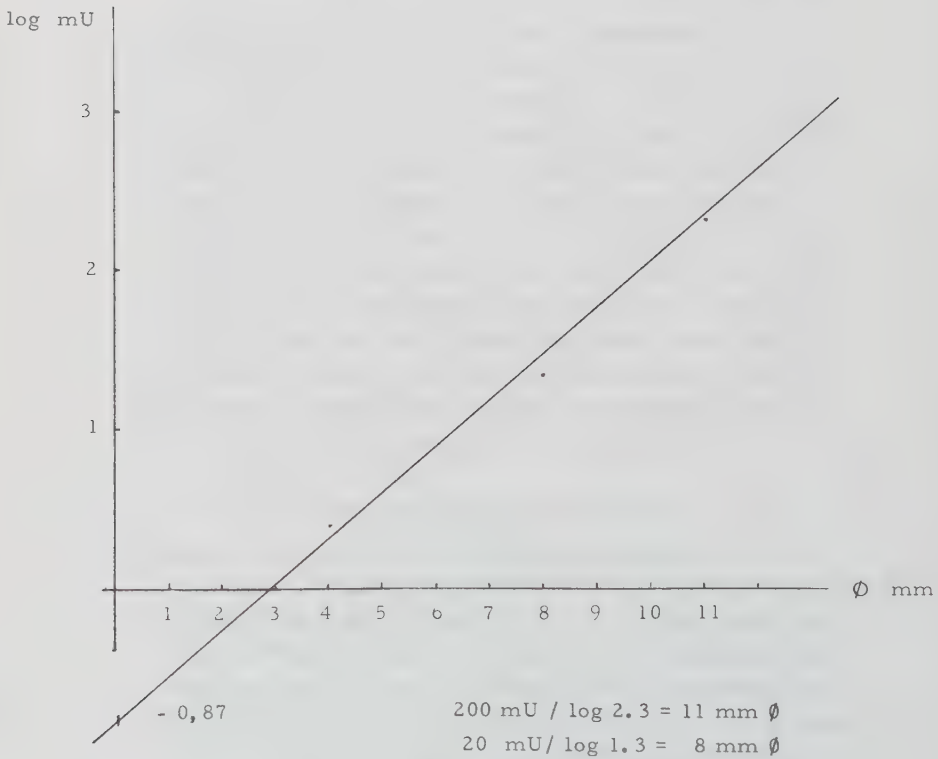


Abbildung 1 gibt das Beispiel einer Eichkurve für Cellulase der mitgeführten Standards.

3. Isolierung cellulolytischer Keime für die Assoziationsversuche aus dem Blinddarm konventioneller Ratten

Für die Isolierung zellulosespaltender Keime wurde der Blinddarminhalt von Ratten verwendet, die im Rahmen von Untersuchungen zur Gesundheitsüberwachung bzw. Normdatenerfassung getötet wurden. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Chloroform. Der Blinddarminhalt wurde unmittelbar nach der Tötung unter aseptischen Kautelen und zur Aufrechterhaltung anaerober Bedingungen mit einer Pasteurpipette entnommen, die zuvor mit sauerstofffreiem CO_2 durchströmt wurde, und sofort in ein vorbereitetes Röhrchen mit präreduziertem Medium verbracht.

3.1. Anzucht cellulolytischer Bakterien auf Selektivnährböden und Aktivitätsnachweis der Isolate

Die Anzucht erfolgte gleichzeitig auf verschiedenen Nährböden und mit verschiedenen Methoden.

a) Flüssignährboden (HOBSON u. MANN, 1971) (s. Anhang) Der Nährboden stand im begasten, präreduzierten Zustand zu Beginn des Versuches bereit.

b) Der gleiche Nährboden wie bei a) mit 2 % Agar auf Platten gegossen.

c) Der Nährboden wie b) in begasten Kulturkolben.

Fünf Röhrchen Flüssignährboden I - V wurden mit jeweils 1 ml verdünnten Blinddarminhalts beimpft und eine Woche bei 37°C bebrütet. Parallel dazu erfolgte die Beimpfung von Kulturkolben mit unverdünntem Blinddarminhalt.
Nach einer Woche Bebrütungsdauer wurde mittels Gram-Färbung das vorhandene Keimmaterial überprüft. Zur weiteren Isolierung erfolgte die Beimpfung der Platten und Kulturkolben mit dem Material aus den fünf bebrüteten Röhrchen.

Die Platten wurden im Anaerobier-Topf (Gas-Pak 100 System, Baltimore Biological Laboratories BBL), die Kulturkolben liegend bebrütet. Bebrütungsdauer war 3 - 7 Tage je nach Wachstumsergebnis. Bebrütet wurde bei 37°C.
Die Überprüfung der cellulolytischen Aktivität erfolgte durch Überschichtung mit N-Cethyl-NNN-trimethylammoniumbromid (HANKIN u. ANAGNOSTAKIS, 1977).
Gewonnene Isolate wurden wieder in Flüssignährboden zur leichteren Handhabung verbracht.

3.2. Charakterisierung der Isolate

Zur Charakterisierung wurde das API-System API 20 für Anaerobier herangezogen (API Labor System GmbH).
Es ermöglicht die schnelle und zuverlässige Durchführung von 21 biochemischen Tests. Weiterhin wurden Gramverhalten, makroskopische und mikroskopische Morphologie, Beweglichkeit und Hämolysefähigkeit berücksichtigt.

4. Besiedlung (Assoziation) keimfreier Ratten mit zellulosespaltenden Keimen, isoliert von konventionellen Ratten (Assoziationsversuch)

Es galt festzustellen, in wieweit eine Assoziation keimfreier Ratten mit aus dem Blinddarm konventioneller Ratten isolierten cellulolytischen Keimen einen Einfluß auf die unter 4.1. im besonderen aufgeführten Parameter hat. Im gleichen Zusammenhang sollte mit der Gabe unterschiedlicher Zellulosemengen im Futter der Einfluß der aufgenommenen Zellulosemenge auf Aktivität und Wirkung der assoziierten cellulolytischen Keime näher untersucht werden.
Als Kontrollgruppen für die Assoziierten-Versuche wurden eine Gruppe (I) konventioneller und eine Gruppe (II) keimfreier Ratten - gefüttert mit Futter unterschiedlichen Zellulosegehalts - eingesetzt.
(Zusammensetzung des Futters im Anhang)

Als Grundlage zur Beurteilung eines Besiedlungseffektes wurde bei den keimfreien und konventionellen Kontrollgruppen neben Futter mit 5 und 30% Zellulose auch Futter mit 0 und 15% Zellulosegehalt eingesetzt.

Gruppe I		16 konv. Ratten
Futter	I	0 % Zellulose
	IV	5 % "
	VI*)	15 % "
	V	30 % "

Gruppe II		16 keimfreie Ratten
Futter	I	0 % Zellulose
	IV	5 % "
	VI *)	15 % "
	V	30 % "

*)Zusammensetzung s. Anhang S. 109

Zur Assoziation wurden drei Isolate mit in vitro guter cellulolytischer Aktivität ausgewählt. Jeweils ein Isolat wurde zur Monoassoziation an keimfreien Ratten in einen Isolator eingeschleust.

Zu Versuchsbeginn wurden etwa 10 g des jeweiligen Futters mit keimhaltigem Nährmedium durchtränkt (wie in zahlreichen Versuchen zur oralen " Infektion " gnotobiotischer Tiere mit intestinalen Bakterien bewährt).

Gruppen zur Assoziation:

Gruppe III		4 keimfreie Ratten
Assoziation		Isolat Nr. 1
Futter	IV	2 Tiere 5 % Zellulose
	V	2 Tiere 30 % "

Gruppe IV		4 keimfreie Ratten
Assoziation		Isolat Nr. 2
Futter	IV	2 Tiere 5 % Zellulose
	V	2 Tiere 30 % "

Gruppe V		10 keimfreie Ratten
Assoziation		Isolat Nr. 3
Futter	IV	5 Tiere 5 % Zellulose
	V	5 Tiere 30 % "

Der Versuch lief über 14 Tage, um eine vollständige Anpassung an Futter und Keim zu gewährleisten.

5. Untersuchungen des Besiedlungseffektes

Nach Ende der Versuche wurden die Tiere mit Chloroform getötet und der Besiedlungseffekt an nachfolgenden Kriterien geprüft.

5.1. Gewichte des Magen-Darm-Kanals
Es wurden Körpergewicht und Magen-Darm-Gewichte gemessen, wobei die Magen-Darm-Gewichte in % zum Körpergewicht (KG) angegeben wurden.

5.2. Wassergehalt im Enddarm
Der Wassergehalt wurde gravimetrisch als Trocknungsverlust bestimmt.

5.3. Stickstoffbestimmung im Enddarminhalt
Die Stickstoffbestimmung erfolgte im Rahmen der Weender - Analyse nach dem Kjeldahl - Verfahren (Mineralisierung der Probe und Bildung von Ammonsulfat, Destillation und Titration des überdestillierten Ammoniaks).

5.4. Zelluloseverwertung
Zur Bestimmung der Zelluloseverwertung wurde der Zellulosegehalt in den Faeces festgestellt. Die Bestimmung wurde nach der Methode von KÜRSCHNER und HANAK (1930) durchgeführt, wobei die Aufschließung durch Kochen mit einem Gemisch aus Essigsäure und Salpeter-

säure erfolgte. Nach anschließenden Waschungen wird bei 106 - 108°C 2 Std. getrocknet und dann gewogen. Aus dem Verhältnis zwischen aufgenommener Zellulosemenge im Futter und fäcaler Tagesausscheidung wurde die scheinbare Verdaulichkeit berechnet nach der Formel:

$$\frac{F - K}{F} \times 100$$

F = Gehalt im verzehrtem Futter
K = Gehalt im Kot

5.5. Cellulolytische Aktivität

Der Blinddarminhalt jedes Tieres wurde mittels radialer Diffusion in substrathaltigem Agar auf seine cellulolytische Aktivität überprüft.
Die Berechnung der Enzymeinheiten erfolgte wie unter 2.3. angegeben.

5.6. Kultur aus Blinddarminhalt

Zur Sicherung des Assoziationserfolges wurden vom Blinddarminhalt jedes Tieres anaerobe Kulturen angelegt. Ein aerober Kulturversuch erfolgte zur Sicherung der Monoassoziation, d.h. zum Ausschluß unerwünschter Kontaminationen, auf Blutagar-Platten ohne Blut und in Röhrchen mit dem hier verwendeten Nährmedium. Zur anaeroben Anzucht wurden die Platten in Anaerobier-Töpfe verbracht, die Röhrchen begast und mit Gummistopfen verschlossen. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C über zwei Tage. Außerdem wurde ein direkter Ausstrich des Blinddarminhalts auf Objektträger vorgenommen und nach Gram gefärbt.

5.7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Aus jeder Versuchsgruppe wurden von einem Tier Teile der Blinddarmwand für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Schleimhaut präpariert, um die assoziierten Keime in situ nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurden 3 mm^2 große Stücke der Darmwand auf Korkplättchen befestigt und in 4%igem Glutaraldehyd fixiert, in Phosphatpuffer gespült und in aufsteigender Acetonreihe entwässert.
Die Trocknung (FROMME u. PFAUTSCH, 1975) sowie die Montage auf Objektträger mit anschließender Goldbedampfung erfolgte im Klinikum Steglitz.
(Augenklinik/ Prof. Witschel)
Die Aufnahmen wurden in der Bundesanstalt für Materialprüfung in Berlin gemacht.

6. Verwertung von C^{14}- markierter Zellulose
(Stoffwechselversuch)

Zur weiteren Sicherung der Zelluloseverwertung wurde die Spaltung radioaktiv markierter (C^{14}) Zellulose untersucht.

Drei Versuchsreihen mit je 5 Tieren wurden durchgeführt:
I. konventionelle Ratten
II. assoziierte Ratten (assoziiert mit Isolat 1)
III. keimfreie Ratten
Für Versuch III. wurde der Stoffwechselkäfig nach Sterilisation in einen Isolator eingebracht, besetzt und mit Zu- und Abluftfiltern versehen. Zur Manipulation wurde eine Handschuh-Blase (Glove-Bag/Ventron) aufgesetzt, die nach Verabreichung der markierten Zellulose entfernt wurde.

Tiere ohne Vorbehandlung wurden dem Haltungskäfig entnommen und ihnen 0,5 ml einer wässrigen Suspension von C^{14}- Zellulose (C^{14}-Zellulose 34,5 µCi/mg New England Nuclear) mit einer Magensonde verabreicht.
Für alle Tiere wurde die gleiche Charge verwendet und der 100 %-Wert durch 4 Messungen von 0,1 ml der Gebrauchslösung bestimmt.
Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechselkäfigen, die mit einem PVC-Kasten ummantelt waren, im Versuch gehalten. Die Versuchsdauer betrug jeweils 24 Std. Aus dem Kasten wurde Luft (500 ml/min) in Waschflaschen (mit Fritte) enthaltend Carbo-Sorb/ Packard zur CO_2 Bindung gesaugt und ein entsprechender Zustrom von Raumluft durch ein Ventil ermöglicht.
Die Waschflaschen wurden nach 1, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden Versuchsdauer gewechselt.
Kot und Urin wurden im Käfig getrennt aufgefangen und bei Versuchsende gewonnen.
Nach Abschluß des Versuches wurden die Tiere durch dekaputieren getötet. Anschließend wurden die Organe: Leber, Niere Dünndarm, Dickdarm und Muskel entnommen, die Gesamtgewichte ermittelt und je 3 Aliquots von ca. 100 mg Feuchtgewebe in Probengläschen eingewogen. Von der Skelettmus-

kulatur wurden zwei Aliquots aus dem Musculus glutaeus entnommen. Das Gesamtmuskelgewicht wurde auf 40 % des Gesamtkörpergewichts festgelegt.
Die nicht flüssigen Proben wurden mit je 1,5 ml Gewebelöser (Soluene-350/Packard) versetzt und 24 Std bei 40°C gehalten.

6.1. Messung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden alle Proben mit je 10 ml der Szintillationsflüssigkeit Instagel/Packard, bei den Carbosorb/Packard - haltigen Proben mit Permafluor/ Packard versetzt.
Die Messung der Proben erfolgte in einem Flüssigkeits-szintillationszählgerät (Packard-Tri-Carb Typ 3380)mit externem Standard gegen eine Vergleichsprobe, die 1 % der gegebenen Radioaktivität enthielt.
Der Szintillationszähler druckte für jede Probe die ipm (Impulse pro Minute) und das Verhältnis zum externen Standard aus.
Zur Quenchkorrektur wurde eine den Zählausbeuten einer Standard-Quenchreihe angepaßte quadratische Funktion verwendet, mit deren Hilfe sich aus der gemessenen Radioaktivität (ipm) die tatsächliche Radioaktivität der einzelnen Proben mittels eines Prozeßrechners errechnen ließ. Damit konnte die Berechnung der prozentualen Verteilung der gegebenen Dosis des markierten C^{14} in der Atemluft, den Organen und Ausscheidungsprodukten erfolgen.
Zur Beschreibung der jeweiligen Ergebnisse in den Tiergruppen werden die Medianwerte sowie die Spannweite in Form von Minimal- und Maximalwerten angegeben.

Betakorrekturkurve

Eichkurve zur Ermittlung der tatsächlichen Radioaktivität bei gemessenen ipm des externen Standards in einem Packard - Tri-Carb Szintillationszähler des Typs 3380

B. ERGEBNISSE

1.1. Ermittlung zellulosespaltender Keime bei konventionellen Ratten in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters (Fütterungsversuch).

Versuchsreihe A - Keimzahl im Blinddarminhalt -
.- Oberflächenkultur in Rollröhrchen -

Bei unterschiedlichem Zellulosegehalt im Futter wurde für die Anzahl der cellulolytischen Keime im Blinddarm folgendes Ergebnis ermittelt.
Es ließen sich bei fast allen Versuchsgruppen Kolonien der Verdünnungsstufe 10^{-5} bis 10^{-7} gut zählen. Da mit bloßem Auge gezählt wurde, mußte sich die Anzahl der Kolonien in einem Rahmen bewegen, der eine Doppelzählung vermied. Diese Forderung wurde bei einer Verdünnung von 10^{-7} unter Berücksichtigung der Impfmenge erfüllt. Durch Überschichten mit N-Cethyl-NNN-trimethylammoniumbromid bildeten sich um cellulolytisch aktive Kolonien Klarzonen. Der Anteil nicht cellulolytischer Keime lag dabei unter 5%, ein Beweis für die gute Selektivität des Nährbodens. Die Kontrollröhrchen zeigten kein Wachstum, so daß Zählfehler durch eventuell wachsende Pansenbakterien nicht berücksichtigt werden mußten.

Die Abbildung 2 zeigt die graphische Darstellung des Besiedlungsverlaufs über die Versuchsdauer von 5 Wochen. Die Keimzahl ermittelt sich jeweils aus drei Werten jedes einzelnen Tieres.
In Tabelle 4 sind die ermittelten Keimzahlen jedes einzelnen Tieres nach Versuchsgruppe und -woche zusammengefaßt. In Spalte 8 sind die Medianwerte der jeweiligen Versuchsgruppe aufgeführt.

Abbildung 2

Graphische Darstellung des Besiedlungsverlaufs mit cellulolytischen Keimen in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters über eine Versuchsdauer von 5 Wochen. Die Keimzahl ermittelt sich jeweils aus drei Werten jedes einzelnen Tieres.

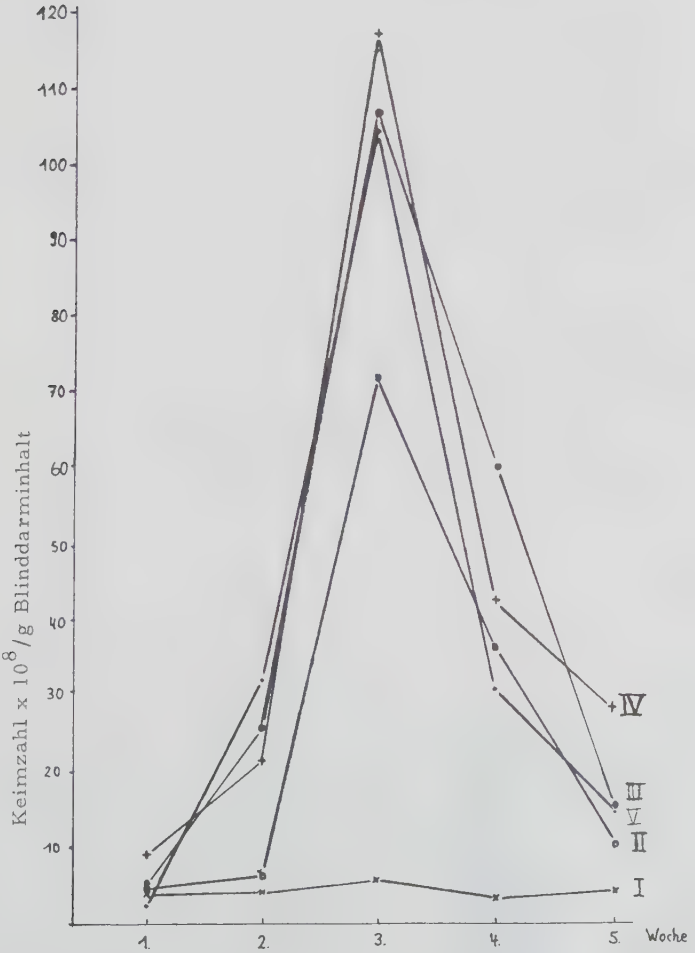


Tabelle 4

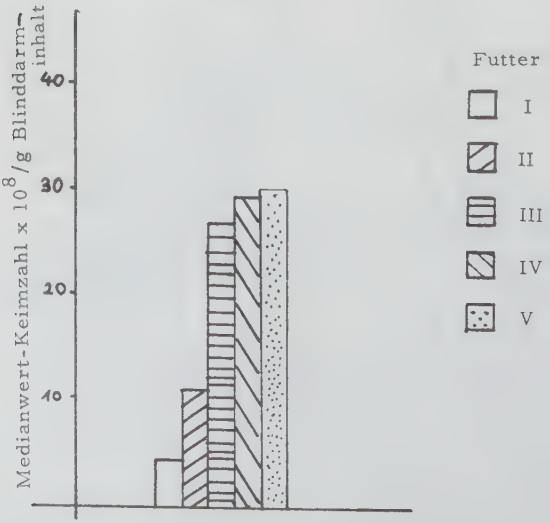
Keimzahl x 10^8/g Blinddarminhalt je Tier und Versuchswoche ermittelt aus drei Werten, sowie die Medianwerte jeder Versuchsgruppe über die gesamte Versuchsdauer. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe beträgt 5.

Futter	% Zellulose	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	Medianwert
I	0	4, 6	3, 3	5, 4	2, 8	3, 1	3, 3
II	5	4, 7	6, 3	72, 5	36, 8	10, 5	10, 5
III	10	4, 9	26, 6	107, 5	60, 0	15, 2	26, 6
IV	5	8, 8	20, 8	117, 5	42, 5	28, 5	28, 5
V	30	2, 5	32, 5	105, 0	30, 0	14, 9	30, 0

(Spannweite der Keimzahlen s. Anhang, Tabelle 15)

Abbildung 3

Darstellung der in Tabelle 4 erfaßten Medianwerte im Säulendiagrammm.
Einfluß des Zellulosegehalts im Futter auf die Zahl cellulolytischer Keime im Blinddarm konventioneller Laboratoriumsratten.



In Abb. 2 zeigt sich innerhalb der Futtermischungen I - III bei gleicher Zellulosequelle ein Anstieg der Keimzahl entsprechend dem Zellulosegehalt im Futter.
Futter IV mit 5% Zellulosegehalt zeigt eine deutlich größere Anzahl cellulolytischer Keime, als Futter II mit gleichem Prozentsatz Zellulose.
Futter V mit 30% Zellulosegehalt zeigt im Versuchsverlauf ein Absinken der erst sehr hohen Keimzahl (2. Woche) auf Werte, die noch unter den Werten der durch Futter III erreichten Keimzahl liegen.
Es wird deutlich, daß die Keimzahl nicht nur von der Menge der verabreichten Zellulose abhängig ist, sondern auch von der Art der Zellulose. Während Futter I-III Futtermischungen mit synthetischer Zellulose sind, enthalten Futter IV und V Zellulose nativer Quellen. In der dritten Versuchswoche zeigt sich ein markanter Anstieg cellulolytischer Keime in allen Versuchsgruppen, die Futter mit Zellulose erhielten. Danach fällt die Keimzahl wieder ab. Auch in Gruppe I, ohne Zellulose in der Nahrung, lassen sich cellulolytische Keime nachweisen. Die Tiere haben wahrscheinlich Weichholzgranulat (Einstreu) aufgenommen, welches sie als Zellulosequelle nutzten.
Der Versuch einer Beurteilung aller Versuchswochen mit Hilfe der Medianwerte ergibt das in Abbildung 3 dargestellte Bild.

Versuchsreihe B - Keimzahl in den Faeces -
- Flüssigkultur -

Es wurde der Versuch gemacht durch wöchentliche Kotuntersuchungen den Verlauf der Keimbesiedlung zu ermitteln. Dabei wurden mit der MPN-Technik die in der Tabelle 5 folgenden Ergebnisse ermittelt.

Tabelle 5

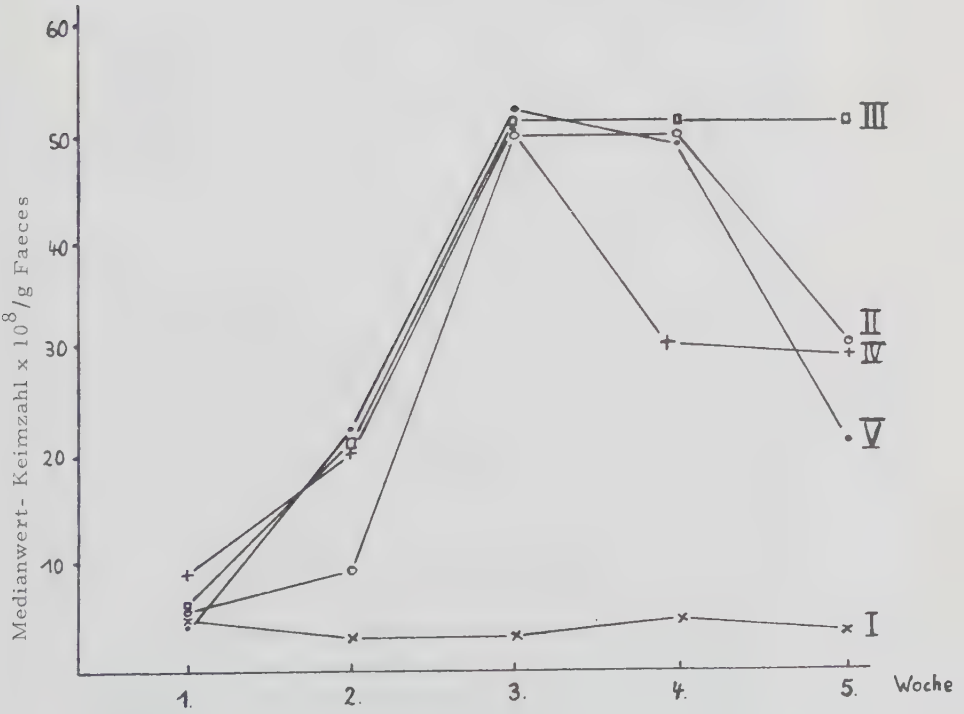
Wöchentliche Kotuntersuchungen zur Ermittlung der Keimbesiedlung mit cellulolytischen Keimen in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters. Keimzahlen x 10^8/g frischen Faeces ermittelt mit der MPN (Most Probable Number) -Technik unter Angabe von Medianwert sowie Minimal- und Maximalwert.
n = Tierzahl

Die Konfidenzintervalle (95%) der auftretenden MPN-Werte sind der Tabelle 14 im Anhang zu entnehmen.

Futter	% Zellulose	n	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	
I	0	5	3, 9	2, 1	4, 3	4, 3	4, 3	
			3, 9	2, 1	2, 3	7, 0	2, 3	
			4, 3	2, 3	2, 3	4, 3	2, 3	
			7, 0	7, 0	3, 9	3, 9	4, 3	
			3, 9	3, 9	2, 0	2, 3	2, 3	
			3, 9	2, 3	2, 3	4, 3	2, 3	Medianwert
			3, 9-7	2, 1-7	2, 0-4, 3	2, 3-7	2, 3-4, 3	mini-max
II	5	5	7, 0	7, 0	46, 0	46, 0	46, 0	
			7, 0	7, 0	46, 0	24, 0	24, 0	
			3, 9	9, 3	46, 0	24, 0	46, 0	
			4, 3	14, 9	24, 0	46, 0	24, 0	
			4, 3	9, 3	46, 0	46, 0	24, 0	
			4, 3	9, 3	46, 0	46, 0	24, 0	Medianwert
			3, 9-7	7-14, 9	24-46	24-46	24-46	mini-max
III	10	5	3, 9	21, 4	46, 0	46, 0	24, 0	
			3, 9	21, 4	46, 0	110, 0	46, 0	
			4, 3	24, 0	110, 0	46, 0	46, 0	
			7, 0	24, 0	46, 0	46, 0	110, 0	
			7, 0	21, 4	110, 0	46, 0	46, 0	
			4, 3	21, 4	46, 0	46, 0	46, 0	Medianwert
			3, 9-7	21, 4-24	46-110	46-110	24-110	mini-max
IV	5	5	14, 9	14, 9	46, 0	24, 0	24, 0	
			7, 0	14, 9	46, 0	46, 0	46, 0	
			7, 0	21, 4	46, 0	24, 0	24, 0	
			4, 3	21, 4	110, 0	46, 0	24, 0	
			4, 3	21, 4	46, 0	24, 0	24, 0	
			7, 0	21, 4	46, 0	24, 0	24, 0	Medianwert
			4, 3-14, 9	14, 9-21, 4	46-110	24-46	24-46	mini-max
V	30	5	3, 9	21, 4	46, 0	46, 0	46, 0	
			3, 9	21, 4	46, 0	46, 0	46, 0	
			9, 3	21, 4	46, 0	21, 4	21, 4	
			9, 3	14, 9	21, 4	21, 4	21, 4	
			3, 9	21, 4	46, 0	46, 0	21, 4	
			3, 9	21, 4	46, 0	46, 0	21, 4	Medianwert
			3, 9-9, 3	14, 9-21, 4	21, 4-46	21, 4-46	21, 4-46	mini-max

Abbildung 4

Medianwerte der Anzahl cellulolytischer Keime x 10^8/g Faeces im Verlauf der Versuchsdauer von 5 Wochen in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters. Auf die Darstellung von Minimal- und Maximalwerten wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Sie sind aber aus Tabelle 5 ersichtlich.



Es zeigt sich, daß sich auch in den Faeces der Zusammenhang zwischen der Anzahl cellulolytischer Keime und dem Zellulosegehalt im Futter nachweisen läßt.
Mit steigendem Zellulosegehalt steigt auch die Anzahl cellulolytischer Keime, die sich mit der MPN-Technik ermitteln ließen.
Innerhalb der Futtermischungen I - III zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Zellulosegehalt im Futter und Anzahl cellulolytischer Keime in den Faeces. Futter IV (5% Zellulosegehalt) und Futter V (30% Zellulosegehalt) mit jeweils anderer Substratquelle, fallen aus dieser Linearität heraus. Es wird wieder deutlich, daß die Zellulosequelle auf die Anzahl cellulolytischer Keime ebenso einen Einfluß hat, wie die Menge der angebotenen Zellulose.
Die Medianwerte der Gesamtkeimzahl, mit Hilfe der MPN-Technik ermittelt, varriieren in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt zwischen $2,3 \times 10^8$ und 46×10^8 Keimen/g Faeces.
Futter III mit 10% Zellulose erbrachte die höchste und Futter I mit 0% Zellulose die niedrigste Keimzahl.

Ebenso wie in Versuchsreihe A zeigt die graphische Darstellung des Besiedlungverlaufes (Abb. 4) in der 3. Woche einen deutlichen Anstieg der Anzahl cellulolytischer Keime. In der Gruppe, die Futter III mit 10% Zellulose erhielt, bleibt der Keimgehalt auf dieser Höhe, während in den anderen Gruppen der Keimgehalt wieder sinkt.

Eine statistische Beurteilung der Ergebnisse wurde für die 5. Versuchswoche durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer unabhängiger Versuchsgruppen ergab der H-Test (Kruskal-Wallis-Test) (SACHS, L., 1969) ein $H = 21,01 > H = 20,0$, d.h. Signifikanz auf 10% Niveau verursacht durch die niedrigen Werte der Gruppe I.
Bei Vergleich der Gruppen II-V (Futter mit Zelluloseanteil) wurde $H = 2,14 < 7,8$ ermittelt und damit ein Unterschied nicht gesichert.

1.2. Cellulaseaktivität im Rattenblinddarm

Der Blinddarminhalt jedes Tieres aus der Versuchsreihe A (Fütterungsversuch) wurde auf seine Cellulaseaktivität überprüft. Im CMC-Agar wurde die Radialdiffusion gemessen und anhand der Regressionsgeraden für die Mittelwerte der Diffusionsdurchmesser der Proben die Aktivität als linearer Schätzwert errechnet.
Auf Grund abweichender Handhabung (nach Tiefgefrieren verarbeitet) konnten die Werte der 4. und 5. Versuchswoche nicht in die bereits ermittelten Ergebnisse eingereiht werden. Der Zeitraum des Keimanstiegs wurde in den ersten drei Wochen erfaßt, so daß von der Wiederholung der Versuche Abstand genommen wurde.
Für die Versuchsgruppen mit unterschiedlichem Zellulosegehalt im Futter ergaben sich die in Tabelle 6 zusammengefaßten Werte.

Tabelle 6
Cellulaseaktivität im Rattenblinddarm in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt des Futters gemessen als Präzipitatdurchmesser im Zelluloseagar.

Futter	I	II	III	IV	V
% Zellulose	0	5	10	5	30
Ø mm je					
Woche u. 1.	4	5	16	18	14
Tier 2.	10	8	12	14	13
3.	5	1o	7	9	10
Mittelwerte					
Ø mm	6,33	7,66	11,66	13,66	12,33
mU	8,33	19,86	271,14	1001,86	420,12

Es zeigt sich, daß auch die Cellulaseaktivität mit steigendem Cellulosegehalt im Futter zunimmt. Futter IV entwickelt allerdings mit 5% Zellulose die höchste Cellulaseaktivität und setzt sich gegenüber der Futtermischung II mit gleichem Zellulosegehalt deutlich ab. Vergleicht man die unter 1.1.(A) ermittelten Keimzahlen mit den in Tabelle 9 zusammengestellten Werten, entspricht die Cellulaseaktivität der Gruppen I-III und V tendenziell der Anzahl zellulosespaltender Keime. Die Aktivität der Keime in Gruppe IV liegt in Bezug auf ihre Keimzahl deutlich höher.
Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß der Zusammensetzung der cellulolytischen Flora entscheidende Bedeutung für ihren Wirkungsgrad zukommt. Die Zusammensetzung der Darmflora hängt wiederum von der Art der verabreichten Zellulose ab.

2. Isolierung cellulolytischer Keime aus dem Blinddarm konventioneller Ratten

2.1. Anzucht auf Selektivnährböden

Nach Anzucht auf Selektivnährböden konnten folgende Stämme von Platten isoliert werden:

1. dunkle, teils gelbliche Kolonien mit unregelmäßigem Rand, Zentrum z. T. leer. Randbereich schleimig
   - gramnegative coccoide Stäbchen
2. stecknadelkopfgroße, weiße, runde Kolonien
   - grampositive Kokken, teils Diplokokken
3. Kolonien mit dunklem Zentrum und fingerartigen Ausläufern
   - grampositives (labiles) Stäbchen teilweise mit terminaler Spore
4. Kolonien mit kurzen Ausläufern
   - grampositives Stäbchen mit endogener mittelständiger Spore, teilweise gekrümmt
5. hirsekorngroße, durchsichtige Kolonien
   - grampositive Kokken, kurze bis lange Ketten

Nach Überimpfen in Flüssigmedium stellten sich die Keime nach Gramfärbung wie folgt dar:

1. gramnegative coccoide Stäbchen

2. grampositive Kokken, kurze Ketten, Diplokokken

3. grampositives (labiles) Stäbchen mit terminaler Spore

4. grampositives Stäbchen mit endogener mittelständiger Spore, Kettenbildung

5. Der Keim konnte in Flüssigmedium nicht kultiviert werden.

2.2. Charakterisierung der Isolate

Tabelle 7 gibt die biochemische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen, sowie weitere Identifizierungsmerkmale wieder.

Isolat	1	2	3	4	5
Gramfärbung	-	+	+	+	+
KOH	+	-	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	+
Beweglichkeit	-	-	+	-	+
Katalase	-	-	+	-	+
Spore	-	-	+	-	+
Indol	-	-	-	+	-
Urease	-	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+
Mannit	+	+	+	+	(+)
Lactose	+	+	-	+	-
Saccharose	-	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	+	+	+
Xylose	+	-	-	+	-
Arabinose	+	-	+	+	(+)
Gelatine	-	-	+	-	-
Äsculin	-	+	-	+	+
Glycerin	(+)	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Melizitose	-	+	+	+	-
Raffinose	-	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+

Zur Assoziation wurden die Isolate 1 - 3 mit in vitro guter cellulolytischer Aktivität ausgewählt. Die Isolate 4 und 5 ließen sich nicht über längere Zeit kultivieren.

Die Bilder 1 - 6 zeigen gramgefärbte Ausstriche und die dazugehörigen Kolonien in Roll-Tubes der Isolate 1 - 3. Dabei erlauben mikroskopisches und makroskopisches Aussehen von Keim und Kolonie in Verbindung mit den in Tabelle 7 aufgeführten biochemischen Eigenschaften eine ungefähre Zuordnung zu Arten von bereits beschriebenen cellulolytischen Keimen.
Isolat 1 läßt sich danach mit Bacteroides succinogenes vergleichen, Isolat 2 entspräche Ruminococcus albus und Isolat 3 hat in den hier betrachteten Kriterien Ähnlichkeit mit Clostridium lochheadii (GIESECKE, 1973).

Zur genaueren Bestimmung müßten neben den in Tabelle 7 aufgeführten biochemischen Charakteristika noch weiterführende Untersuchungen über Fermentationsprodukte, Nährstoffbedarf oder Wachstumstemperaturen gemacht werden.

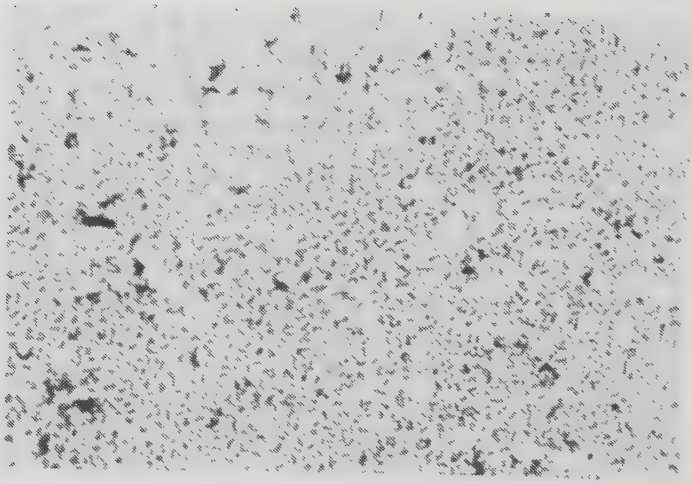


Bild 1
Keime des Isolat 1; Gramfärbung

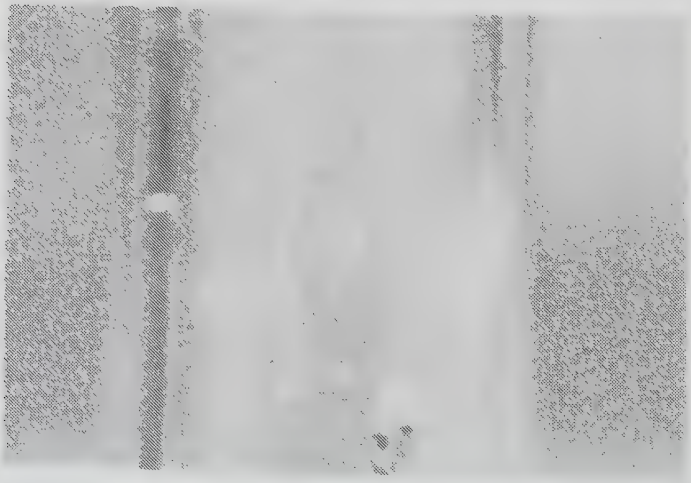


Bild 2
Kolonien des Isolat 1; Roll-Tubes

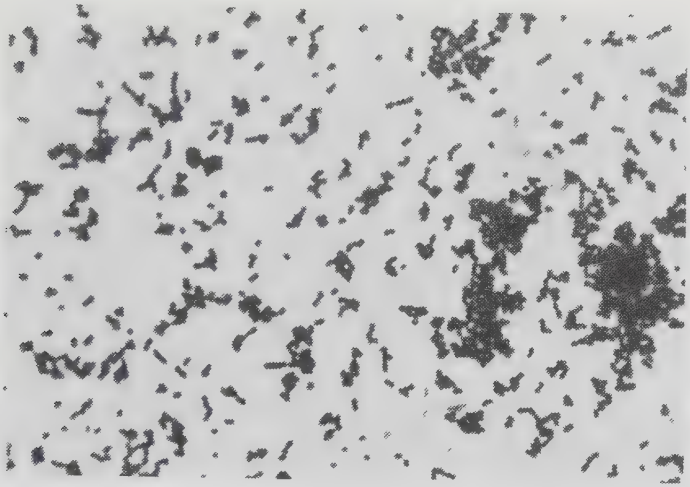


Bild 3
Keime des Isolat 2; Gramfärbung

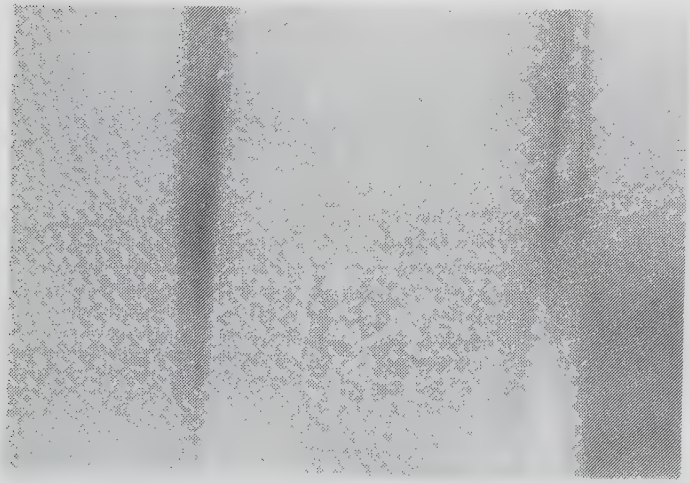


Bild 4
Kolonien des Isolat 2; Roll-Tubes

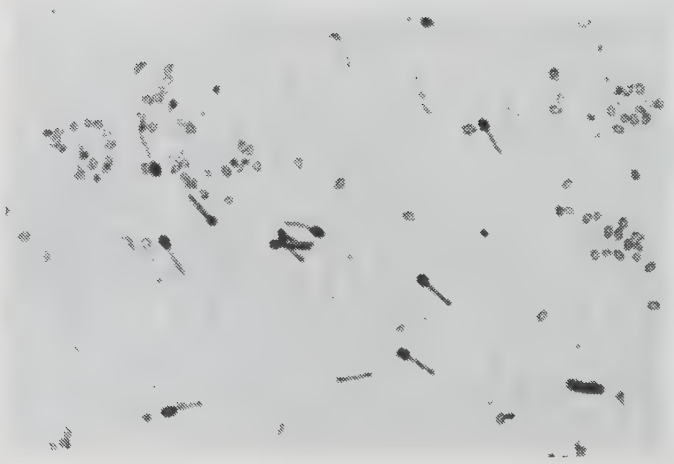


Bild 5
Keime des Isolat 3; Gramfärbung

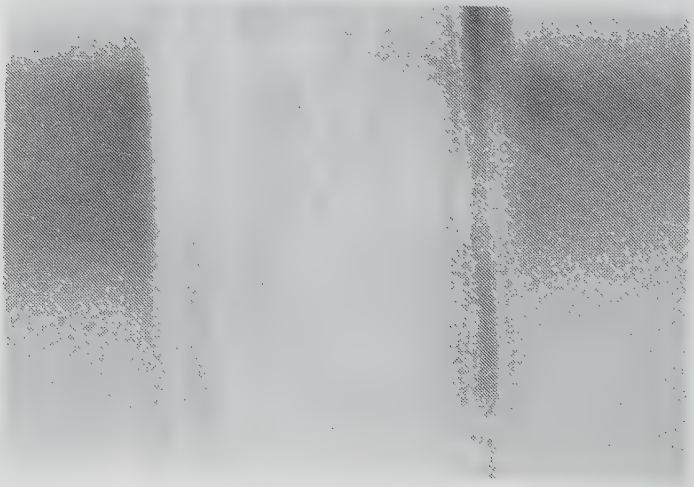


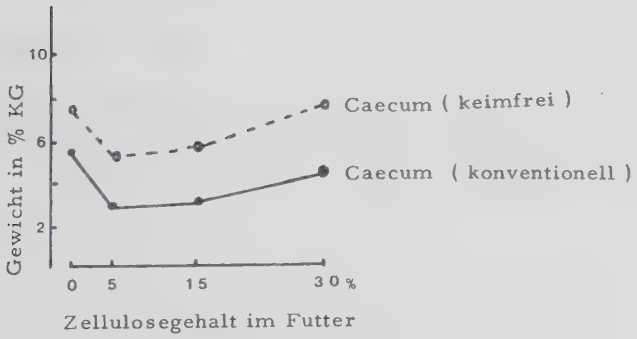
Bild 6
Kolonien des Isolat 3; Roll-Tubes

3. Besiedlung (Assoziation) keimfreier Ratten mit zellulosespaltenden Keimen, isoliert von konventionellen Ratten (Assoziationsversuch)

Als Grundlage zur Beurteilung eines Besiedlungseffektes wurden bei den keimfreien und konventionellen Kontrollgruppen neben Futter II mit 5% und Futter V mit 30% Zellulose auch Futter I mit 0% und Futter VI mit 15% Zellulose eingesetzt.
Aus der Abbildung 5 ist ersichtlich, daß bei Einsatz von Zellulose im Futter das relative Blinddarmgewicht gegenüber Futter ohne Zellulose erheblich sinkt, um dann mit steigendem Zellulosegehalt im Futter wieder anzusteigen.

Abbildung 5

Einfluß des Zellulosegehaltes im Futter
auf das Blinddarmgewicht



3.1. Besiedlungseffekte auf Körpergewicht, Magen-Darm-Gewichte, Wassergehalt und Stickstoffgehalt im Enddarm

Da nicht alle fünf Versuchsreihen parallel liefen, standen zum jeweiligen Versuchsbeginn keine gleichaltrigen Tiere zur Verfügung.
Die keimfreien und konventionellen Tiere waren bei Versuchsbeginn 5 Wochen alt.
Die Assoziation mit Isolat 1 und 2 erfolgte an keimfreien Tieren von 7 Wochen und Isolat 3 wurde keimfreien Tieren von 5 Wochen verabreicht.

In Tabelle 8 sind die Werte für Magen-Darm-Gewichte, Wassergehalt im Enddarm und Stickstoffgehalt im Enddarm bei 5% Zellulose im Futter und unter Einfluß der Monoassoziation zusammengestellt. Als Vergleichswerte dienen die Ergebnisse von keimfreien und konventionellen Tieren, um zu ermitteln, ob eine Anpassung an das konventionelle Tier erfolgt.

Dabei zeigt sich, daß durch Isolat 1 und 2 Magen-, Dünndarm- und Blinddarmgewichte nahezu die Werte konventioneller Tiere erreichen, bei Isolat 2 zusätzlich das Enddarmgewicht.
Isolat 3 bleibt bei 5% Zellulose im Futter praktisch ohne Einfluß.
Der Wassergehalt im Enddarm wird durch eine Monoassoziation mit cellulolytischen Keimen kaum beeinflußt.
Der Stickstoffgehalt nimmt in allen drei Gruppen zu.

Tabelle 8
Besiedlungseffekte zellulosespaltender Keime bei keimfreien Ratten im Vergleich zu keimfreien und konventionellen Tieren mit 5% Zellulose im Futter
Die Tiere erhielten Futter IV.

			Monoassoziation mit Isolat		
Status	keimfrei	konv.	1	2	3
Tierzahl n	4	4	2	2	5
Alter/Wochen	5	5	7	7	5
Körpergewicht g	115	138, 9	211, 5	226	134
Magen-Darm-Gew. %KG	21, 3	15, 2	15, 2	13, 8	22, 9
Magengew. %KG	5, 4	2, 7	2, 4	2, 2	4, 9
Dünndarmgew. %KG	7, 5	6, 5	5, 7	5, 3	7, 9
Blinddarmgew. %KG	6, 3	4, 0	4, 4	4, 4	7, 0
Enddarmgew. %KG	2, 0	1, 7	2, 1	1, 6	2, 5
Wassergehalt -Enddarm %	84, 8	67, 1	84, 9	80, 7	81, 1
N-Enddarm %	2, 2	2, 17	3, 12	2, 9	2, 8

In Tabelle 9 sind die Werte der gemessenen Parameter unter Einfluß der Monoassoziation bei 30% Zellulose im Futter zusammengefaßt.
Auf Grund der Zusammensetzung des Futters zeigten sich bei allen Versuchstieren Gewichtsverluste, die nicht ohne Einfluß auf die Gesamtentwicklung der Individuen bleiben können. So läßt sich zwar der Einfluß der Monoassoziation beschreiben, aber die physiologischen Abweichungen, die durch Mangelernährung auftreten müssen, geben den Ergebnissen nicht den gleichen Stellenwert, wie den Ergebnissen in Tabelle 8.
Bei allen Versuchsgruppen kommt es im Vergleich zu den mit 5% Zellulose im Futter ernährten Tieren zu einer Erhöhung der relativen Dünndarm-, Blinddarm- und Enddarmgewichte. Das Magengewicht steigt beim konventionellen Tier und bei Assoziation mit Isolat 1 und 2.
Beim keimfreien Tier und bei Assoziation mit Isolat 3 sinkt das Magengewicht.
Im Vergleich zu der Versuchsreihe mit 5% Zellulose im Futter zeigt sich hier ein geringerer Einfluß der Monoassoziation. Die Annäherung an Werte konventioneller Tiere ist bei 30% Zellulose im Futter nur gering.
Isolat 2 zeigt das beste Blinddarmreduktionsvermögen.
Die Wirkung auf den Wassergehalt ist minimal.
Bei Monoassoziation mit Isolat 1 erfolgt eine Senkung des Wassergehaltes, sowie des Stickstoffgehaltes sowohl gegenüber dem keimfreien Tier, als auch gegenüber der mit Isolat 1 assoziierten Gruppe mit 5% Zellulose im Futter.

Wie sich schon bei der Keimzahlbestimmung und der Ermittlung der Cellulaseaktivität gezeigt hat, kommen bei unterschiedlichem Zellulosegehalt im Futter offensichtlich verschiedene cellulolytische Keimspezies zur Wirkung.
Ursächlich mag das mit den differierenden Mengen der anfallenden Fermentationsprodukten und den damit zusammenhängenden Veränderungen der Lebensbedingungen im Magen-Darm-Kanal, insbesondere im Blinddarm, verbunden sein.

Tabelle 9
Besiedlungseffekte zellulosespaltender Keime bei keimfreien Ratten im Vergleich zu keimfreien und konventionellen Tieren mit 30% Zellulose im Futter
Die Tiere erhielten Futter V.

			Monoassoziation mit Isolat		
Status	keimfrei	konv.	1	2	3
Tierzahl n	4	4	2	2	5
Alter/Wochen	5	5	7	7	5
Körpergewicht g	65, 7	59, 3	64, 8	59, 5	74
Magen-Darm-Gew. %KG	27, 6	30	28, 3	29, 3	28, 7
Magengew. %KG	2, 6	5, 7	3, 3	3, 7	3, 5
Dünndarmgew. %KG	9, 1	10, 3	9, 3	10, 5	1o, 1
Blinddarmgew. %KG	10, 4	7, 9	9, 3	8, 6	9, 9
Enddarmgew. %KG	5, 5	5, 2	5, 1	5, 5	4, 4
Wassergehalt -Enddarm %	83, 4	67, 4	79, 6	83	84, 4
N-Enddarm %	2, 17	2, 32	2, 08	3, 45	2, 97

In den Abbildungen 6 bis 12 ist der Zusammenhang zwischen Zellulosegehalt im Futter und Besiedlung mit der Wirkung auf die in Tabelle 8 und 9 gemessenen Parameter graphisch dargestellt.

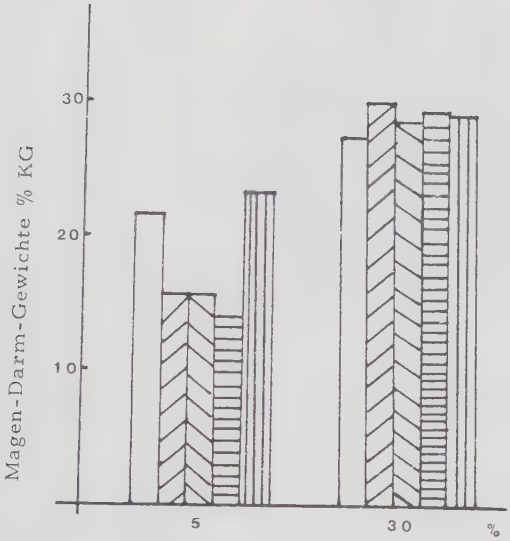
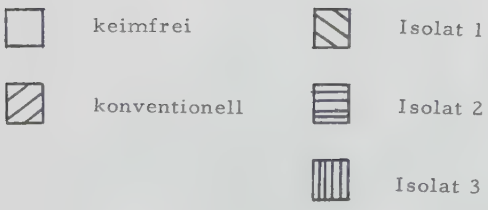


Abbildung 6

Magen-Darm-Gewichte in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter



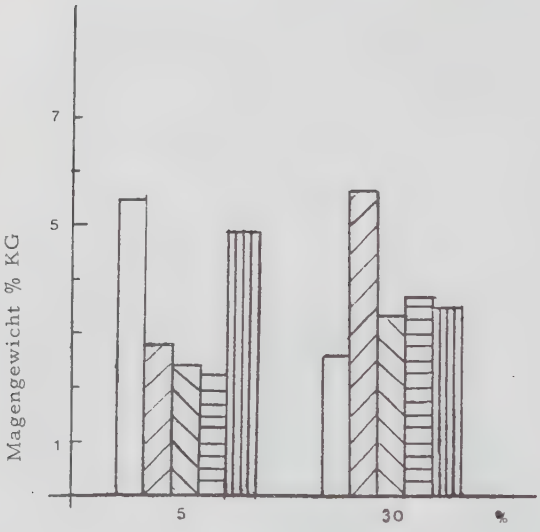


Abbildung 7

Magengewichte in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter

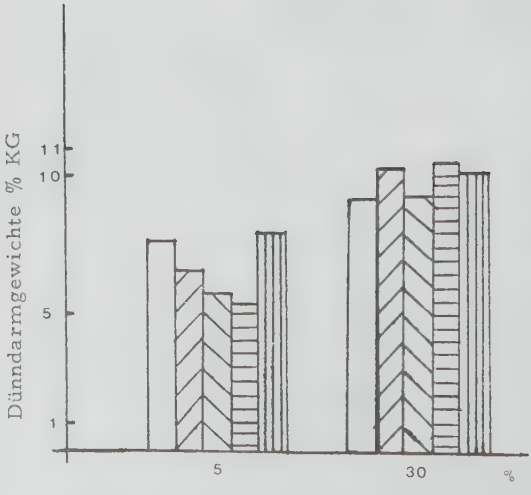


Abbildung 8

Dünndarmgewichte in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter

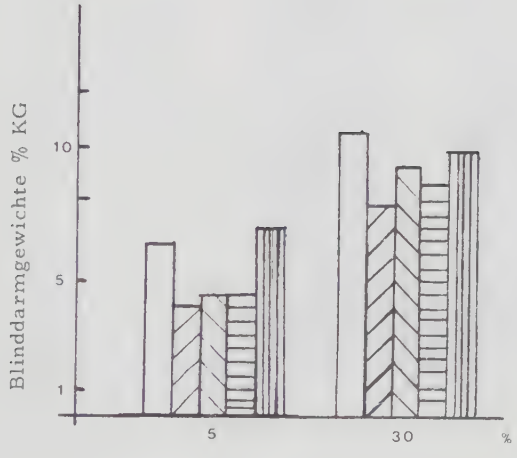


Abbildung 9

Blinddarmgewichte in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter

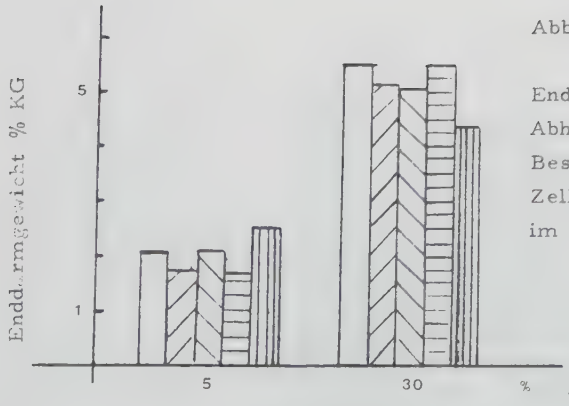


Abbildung 10

Enddarmgewichte in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter

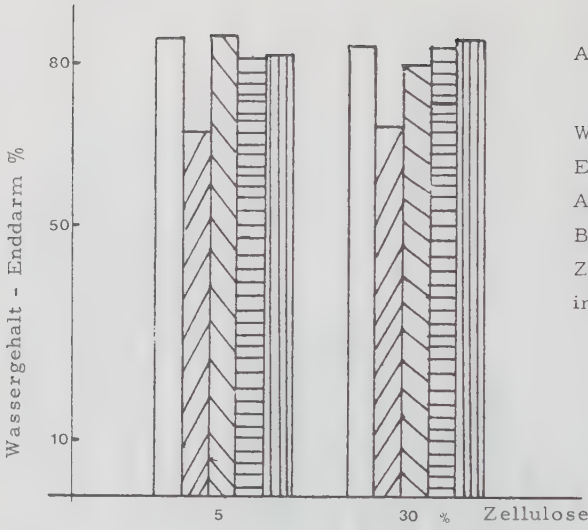


Abbildung 11

Wassergehalt im Enddarm in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter

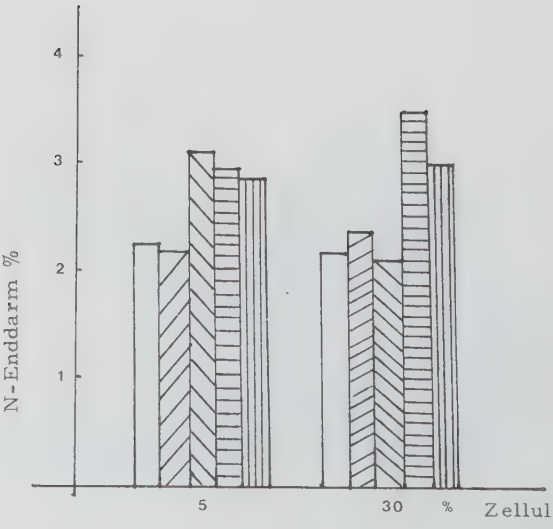


Abbildung 12

Stickstoffgehalt im Enddarm in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter

3.2. Cellulolytische Aktivität im Verdauungstrakt assoziierter gnotobiotischer Ratten

Zur Beurteilung des Besiedlungseffektes wurde die cellulolytische Aktivität im Cäcum der besiedelten Ratten im Vergleich zu keimfreien Ratten bestimmt und folgende Ergebnisse ermittelt.

Tabelle 10
Cellulolytische Aktivität im Blinddarm in Abhängigkeit von Besiedlung und Zellulosegehalt im Futter.
Es sind die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe angegeben.

Status	Tiere/n	mU (5% Zellulose) Futter IV	mU (30 % Zellulose) Futter V
keimfrei	4	-	-
monoassoziiert			
Isolat 1	2	91	336
Isolat 2	2	43	91
Isolat 3	5	43	91

Durch Verabreichung der gewonnenen cellulolytischen Keime, entwickeln die assoziierten Tiere cellulolytische Aktivität. Dabei zeigt sich Isolat 1 mit 91 mU bei 5% und mit 336 mU bei 30% Zellulose im Futter am wirkungsvollsten. Isolat 2 und Isolat 3 liegen bei gleicher Aktivität deutlich darunter. Mit Erhöhung des Zellulosegehalts zeigt sich in allen drei assoziierten Gruppen eine Steigerung der cellulolytischen Aktivität.

3. 3. Zelluloseverwertung

Zur Beurteilung des Besiedlungseffektes wurde in einem Stoffwechselversuch die Zelluloseverwertung im Vergleich zu keimfreien und konventionellen Tieren bestimmt und folgende Ergebnisse ermittelt.

Tabelle 11 gibt die Werte der scheinbaren Verdaulichkeit der Zellulose im Futter mit 5% bzw. 30% Zellulosegehalt wieder. Der Versuch wurde mit jeweils 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt. (n=2)

Futter IV : 5% Zellulose
17 g täglich rationiert

Futter V : 30% Zellulose
15 - 20g tägliche Aufnahme

Status	Aufnahme mg		Ausscheidung mg		Verdaulichkeit	
	IV	V	IV	V	IV	V
konv.	900	6000	547	4000	39%	33%
Isolat 1	900	4500	400	1960	55%	56%
Isolat 2	900	4500	600	3375	33,4%	25%
Isolat 3	900	4500	500	2600	45%	42%
keimfrei	900	4500	1200	4600	-	-

Tabelle 11 gibt die scheinbare Verdaulichkeit von Futter mit 5 bzw. 30% Zellulosegehalt in Abhängigkeit von der Besiedlung wieder.
Es zeigt sich, daß unabhängig von der Besiedlung , die Zellulose in Futter IV bei 5% Zellulosegehalt mit 39% besser verwertet wird, als die Zellulose in Futter V bei 30% Zellulosegehalt mit 33% scheinbarer Verdaulichkeit.
Betrachtet man den Besiedlungseffekt im Vergleich zum konventionellen Tier, wird deutlich, daß eine Monoassoziation mit cellulolytischen Keimen zu einer guten Zelluloseverwertung führt. Mit Isolat 1 und 3 werden sogar Werte erreicht, die noch über den Werten konventioneller Tiere liegen, wobei Isolat 1 bei 5% und bei 30% Zellulosegehalt mit 55% bzw. 56% die beste Verdaulichkeit aufweist.

3.4. Kultur aus Blinddarminhalt

Bei der aeroben Anzüchtung des Blinddarminhaltes der assoziierten Tiere erfolgte kein Wachstum.
Auf den Platten und in den Röhrchen, die unter anaeroben Bedingungen bebrütet wurden, ließ sich jeweils der Keim nachweisen, der zur Monoassoziation verwendet wurde.
In den gramgefärbten Abstrichen der Blinddarmschleimhaut bestätigte sich der Besiedlungserfolg.

3.5. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Aufnahmen bestätigen - wie die Kultur (3.4.) die Anwesenheit jeweils einer bakteriellen Form, die zur Besiedlung verabreicht wurde.
Bei der Durchmusterung der Präparate konnte auch eine unterschiedliche Intensität der Besiedlung – entsprechend unterschiedlichen Aktivitäten - beobachtet werden.

Rasterelektonenmikroskopische Aufnahmen

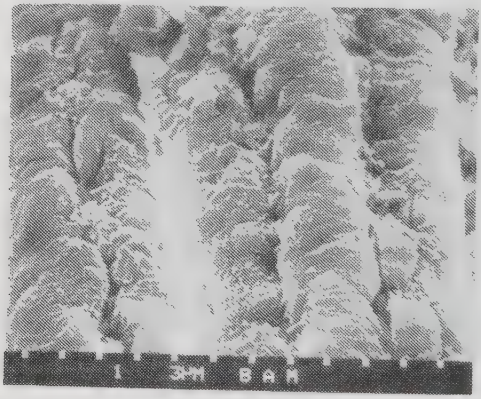


Bild 7
Blinddarmschleimhaut
einer keimfreien
Ratte

Bild 8
Blinddarmschleimhaut
einer konventionellen
Ratte

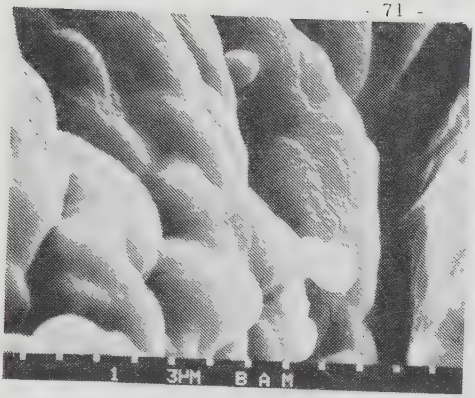


Bild 9

Blinddarmschleimhaut monoassoziierter Ratten

besiedelt mit cellulolytischen grampositiven Kokken

Bild 10

besiedelt mit cellulolytischen gramnegativen Stäbchen

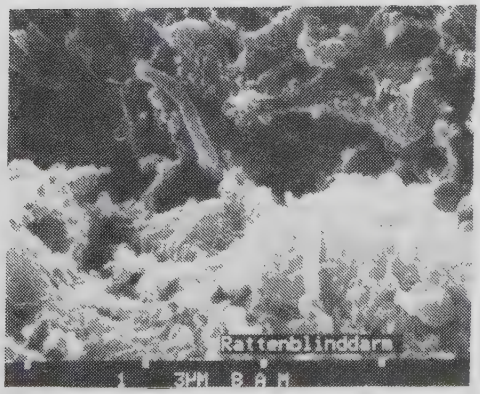


Bild 11

besiedelt mit cellulolytischen grampositiven Stäbchen

3.6. Verwertung von C^{14}- markierter Zellulose (Stoffwechselversuch)

Zur weiteren Sicherung der Zelluloseverwertung wurde die Spaltung radioaktiv markierter C^{14}-Zellulose bei konventionellen, assoziierten und keimfreien Ratten untersucht. Zur Assoziation wurde das Isolat 1 ausgewählt, weil es die beste Zelluloseverwertung in Versuch 3.2. und die höchste Cellulaseaktivität in Versuch 3.3. zeigte.
Es wurden die in Tabelle12zusammengestellten Werte ermittelt.

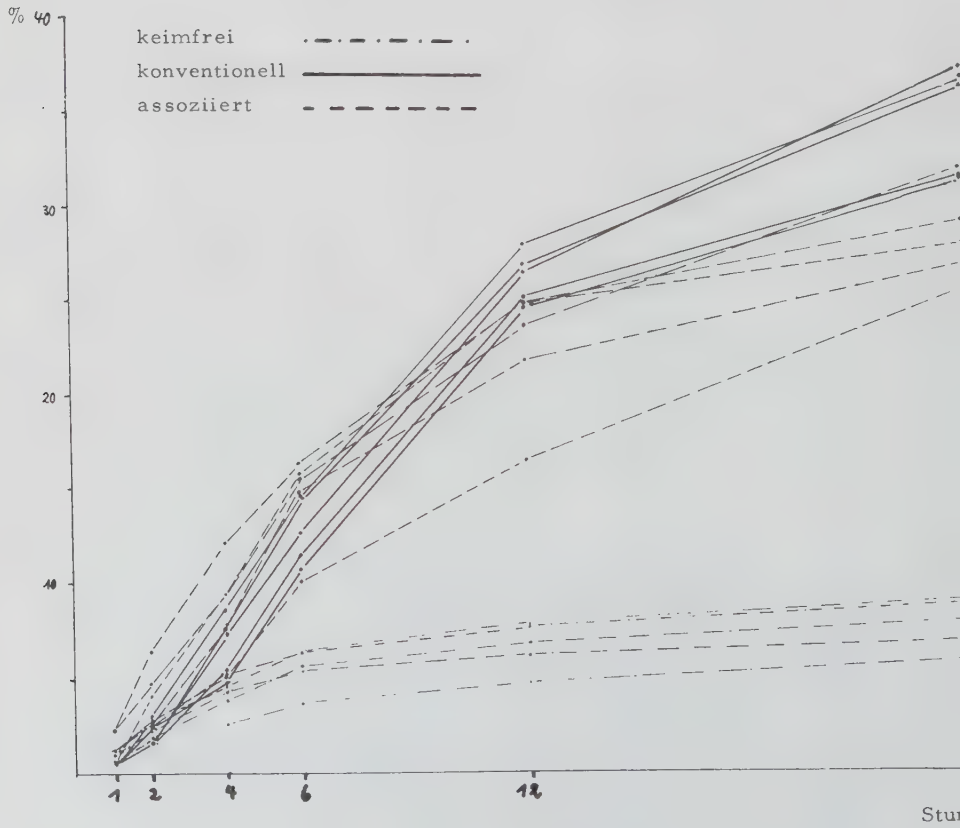
Tabelle 12 Angaben der Dosis C^{14}-Zellulose in der Atemluft nach 1, 2, 4, 6, 12, 24 Stunden, in Organen (Leber, Niere, Muskel), als nicht aufgenommenes C^{14} in Dünndarm, Dickdarm und Kot, sowie im Urin. Alle Werte sind pro Tier und als % der verabreichten Gesamtdosis dargestellt. Es werden pro Gruppe sowohl Median-, als auch Minimal- und Maximalwerte in % der Gesamtdosis dargestellt.

	Tier-Nr.	% Dosen in Atemluft							„Ansatz"				„nicht-resorbiert"				Urin	Σ
		1h	2h	4h	6h	12h	24h	Gesamt	Leber	Niere	Muskel	Gesamt-„Ansatz"	Dünndarm	Dickdarm	Kot	Gesamt-Darminhalt		
konventionelle Tiere	1	0,4	2,6	5,5	5,9	13,4	8,7	36,5	1,6	0,4	3,8	5,8	1,4	5,7	49,3	56,4	3,3	102,0
	2	0,4	2,0	2,3	5,9	13,6	6,5	30,7	1,5	0,4	2,0	3,9	1,1	14,8	54,2	70,1	3,9	108,6
	3	0,5	1,1	6,3	6,9	11,9	9,1	35,8	0,7	0,4	4,8	5,9	1,6	2,6	50,4	54,6	4,3	100,6
	4	0,5	1,3	5,5	5,2	13,8	10,9	37,2	2,3	0,9	4,5	7,7	2,2	13,8	42,6	58,6	3,4	106,9
	5	0,4	2,0	2,7	6,1	13,6	6,1	30,9	1,6	0,5	4,6	6,7	1,2	10,2	49,4	60,8	4,3	102,7
						35,8	[30,7 - 37,2]			5,9	[3,9 - 7,7]			58,6	[54,6 - 70,1]		[3,9 / 3,3-4,3]	
assoziierte Tiere	6	1,2	1,4	2,3	5,1	6,2	8,8	25,0	4,8	1,6	3,3	9,7	10,2	24,3	24,6	59,1	5,0	98,8
	7	0,5	3,5	5,2	6,6	8,6	2,9	27,3	2,5	1,1	5,7	9,3	1,2	20,0	41,8	63,0	3,6	103,2
	8	2,2	4,0	5,8	4,1	8,4	4,2	28,7	3,0	0,8	4,5	8,3	3,2	20,4	45,1	68,7	2,8	108,5
	9	1,2	1,3	4,8	7,3	6,9	4,9	26,4	3,2	1,0	4,9	9,1	2,6	17,3	48,7	68,6	3,5	107,6
	10	2,2	2,5	4,5	6,4	7,6	8,3	31,5	2,2	1,1	3,2	6,5	3,2	26,1	30,6	59,9	4,8	102,7
						27,3	[25,0 - 31,5]			9,1	[6,5 - 9,7]			63,0	[59,1 - 68,7]		[3,6 / 2,8-5,0]	
keimfreie Tiere	11	1,0	1,3	2,6	1,2	1,2	1,1	8,4	3,5	2,9	2,2	8,6	5,6	44,6	30,7	80,9	2,6	100,8
	12	0,7	1,7	1,7	1,1	0,8	0,6	6,6	2,1	0,5	2,9	5,5	2,3	30,6	56,7	89,6	3,2	104,9
	13	0,9	1,6	2,6	1,1	1,3	1,2	8,7	2,2	1,1	5,1	8,4	13,3	38,6	28,9	80,8	3,2	101,1
	14	0,6	1,2	2,1	1,5	1,2	1,1	7,7	0,8	0,5	4,1	5,4	1,1	25,8	61,4	88,3	2,7	104,1
	15	-	-	2,6	1,0	1,0	1,1	5,7	1,0	0,5	4,4	5,9	17,3	33,8	32,2	83,3	1,1	96,0
						7,7	[5,7 - 8,7]			5,9	[5,4 - 8,6]			83,3	[80,8 - 89,6]		[2,7 / 1,1-3,2]	

Der zeitliche Ablauf für die Abatmung des verabreichten C^{14} ist als Summenkurve in Abbildung 13 dargestellt.

Abb. 13

Summenkurve der Aktivität in % der verabreichten Dosis C^{14}-Zellulose in der Atemluft von 1 - 24 Stunden.



Es zeigt sich ganz deutlich, daß beim konventionellen Tier mit 35,8% der verabreichten Dosis C^{14}-Zellulose in der Atemluft die Zelluloseverwertung am ausgeprägtesten ist. 5,9% C^{14} lassen sich als "Ansatz" in Organen nachweisen. 58,6% sind beim konventionellen Tier als "nicht-resorbiert" in Darm und Kot festzustellen. 3,9% C^{14} im Urin geben einen weiteren kleinen Prozentsatz gespaltener Zellulose an.

Bei mit Isolat 1 assoziierten Tieren zeigen sich Ergebnisse, die denen der konventionellen Tiere sehr ähnlich sind. 27,3% C^{14} erscheinen in der Atemluft, 9,1% im "Ansatz", 3,6% im Urin. 63% C^{14} in Darm und Kot geben den Anteil der nicht resorbierten Zellulose an. Die assoziierten Tiere zeigen damit ähnlich starke Zelluloseverwertung wie die konventionellen Tiere.

In der Gruppe der keimfreien Tiere sind in der Atemluft 7,7% C^{14} nachweisbar, ohne daß mikrobielle Tätigkeit vorhanden ist. 5,9% C^{14} zeigen sich in den Organen und 2,7% C^{14} im Urin.

Mit 83,3% C^{14} als "nicht-resorbierter" Anteil zeigt sich eindeutig, daß nur geringe Mengen C^{14} abgespalten werden. Der Befund einer Spaltung von C^{14}- markierter Zellulose bei keimfreien Tieren wurde nicht erwartet und hat mit Auftreten von 5,7 - 8,7% der verabreichten Dosis in der Atemluft eine Größenordnung, die einer Klärung bedarf.

Die Befragung des Herstellers ergab zwar Informationen über die Herstellung, nicht jedoch über die Reinheit des Präparates. Entsprechend der Vermutung eines Anteils an anderen pflanzlichen Baustoffen (Hemicellulosen, Stärke) wurde unter Einsatz der jeweiligen Fermente ein indirekter Nachweis versucht.

Es wurden deshalb das Präparat und zur Kontrolle die entsprechenden Substrate (Zellulose, Hemizellulose, Stärke) ohne und mit vorherigem Aufschluß durch 30 min Erhitzen bei 60°C mit 8 N HCl in Anwesenheit von DMSO (Dimethyl sulfoxyd)(Boehringer/Mannheim:Enzymatische Analysen

für die Lebensmittelchemie, 1971, S. 93) mit den Fermenten Cellulase, Hemicellulase, Amyloglycosidase und α-Amylase inkubiert und danach die Fehling-Probe auf reduzierende Zucker , sowie eine dünnschicht-chromatographische Trennung durchgeführt unter Mitführung von Glukose, Cellobiose und Maltose als Referenzsubstanz.
(Kieselgel 60; 0, 25 mm; Laufmittel:Aceton/Wasser 90:10 ; 1 Stunde aufsteigend; Nachweis: Schwefelsäure 105°C, 5 min)

Neben den kongruenten Ansätzen wurde die Freisetzung von Zucker aus dem Präparat (C^{14}- Zellulose) durch Hemicellulase und nach Aufschluß auch durch Amyloglycosidase festgestellt. Dünnschicht-chromatographisch wurde das Auftreten von Cellobiose (Cellulase, Hemicellulase), Glukose (Amyloglycosidase) und Maltose (α- Amylase) ermittelt.
Der Versuch, die dünnschicht-chromatographische Trennung im Scanner auf C^{14}- Abtrennung zu prüfen verlief demgegenüber negativ. Der markierte Kohlenstoff entweicht vermutlich bei der Inkubation oder wahrscheinlicher bei der Verbrennung durch H_2SO_4-Behandlung.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde und des hohen Anteils (80, 8- 89, 6%) nicht aufgenommener Aktivität in der Keimfrei-Gruppe des Tierversuchs liegt der Schluß nahe, daß das Präparat einen Anteil durch die Verdauungsfermente des keimfreien Tieres aufschließbare C^{14}-Quelle enthält.
Für die Ergebnisse bedeutet das, daß die Keimfrei-Gruppe nicht Negativ-Kontrolle, sondern Basis-Wert darstellt.

Eine statistische Beurteilung der Ergebnisse der drei Gruppen des Isotopen-Versuchs unter Anwendung des H-Tests (Kruskal-Wallis-Test) ergab H-Werte für die Gesamtwerte

der Atemluft	$H = 11,58 > 7,93$	(0, 01)
des Ansatzes	$H = 5,59 > 4,56$	(0, 1)
von Darm/Kot	$H = 9,98 > 7,93$	(0, 01)
des Urins	$H = 9,65 > 7,93$	(0, 01)

und damit Signifikanz, verursacht durch die Werte der Keimfrei-Gruppe.

Beim zwei-Gruppen-Vergleich der konventionellen und assoziierten Tiere unter Anwendung des U-Tests (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) wurde für die Atemluft und den Ansatz $U = 2 < 5\ (0,1)$ und damit Signifikanz ermittelt, während für

Darm/Kot $U = 7 > 5\ (0,1)$ und

Urin $U = 11 > 5\ (0,1)$

ein Unterschied nicht zu sichern war.

IV. DISKUSSION

Der Beitrag der cellulolytischen Darmflora zur Verdauung der Rohfaser und damit zur Gewinnung von Energie, die der Wirt nutzt, ist nicht nur dann von Interesse, wenn es gilt, eine zur Assoziation geeignete und standardisierte Darmflora zu erhalten.

Außerhalb der Versuchstierkunde ist besonders in der Ernährungsphysiologie der Nutztiere und des Menschen sowie im technischen Bereich (Biogas-Produktion) der Abbau von Zellulose durch Cellulolyten und deren Cellulasen von Bedeutung.

MANDELS und WEBER (1969) diskutieren die Erschließung neuer Nährstoffquellen für die expandierende Bevölkerung durch Einsatz von zellfreien Cellulasen aus Trichoderma viride, um Rohfaser für den Menschen nutzbar zu machen.

Die Biotechnologie hat sich zur Aufgabe gesetzt, die anfallenden zellulosehaltigen Abfallstoffe nutzbar zu machen. WINTER und WIEGEL (1981) sprechen von der Möglichkeit, 4-6 % des Energiebedarfs der Bundesrepublik über die Fermentation von organischen Abfällen decken zu können. Die Herstellung wertvoller Stoffwechselprodukte, wie z. B. Antibiotika, Aminosäuren und Vitamine, und die Reinigung zellulosehaltiger Abwässer sind Aspekte, die von FÄHNRICH et al. (1981) hervorgehoben werden. Voraussetzung für die Entwicklung reproduzierbarer und regelbarer Verfahren sind gute Kenntnisse über die zelluloseabbauenden Mikroorganismen und deren Enzymsysteme.

In der Versuchstierkunde macht die allgemeine Forderung nach einem mikrobiell definierten Versuchstier es notwendig zu lernen, welche Spezies im Darmkanal vorkommen, wo und in welcher Zahl sie existieren und was ihr Stoff-

wechsel ist bei Zufuhr unterschiedlicher Substrate und welche Spezies notwendig bzw. nützlich für den Wirt sind.

Gegenüber umfangreichen Kenntnissen über die mikrobielle Aktivität im Intestinaltrakt landwirtschaftlicher Nutztiere ist das Wissen in dieser Hinsicht bei Laboratoriumsnagern relativ gering (GIESECKE und HENDERICKX, 1973).

Die Aufgabe der Besiedlung keimfreier Tiere mit einer physiologische Funktionen gewährleistenden Flora ist bisher weitgehend ungelöst.

In der vorliegenden Arbeit werden Vorkommen, Funktion und Wirkung cellulolytischer Keime bei Laboratoriumsratten näher untersucht. Da der Zelluloseabbau im Darmkanal nur mikrobiell stattfindet, sind gerade die Cellulolyten der Darmflora zur Gewinnung einer standardisierten Darmflora von besonderem Interesse.

Experimentelle Untersuchungen an/mit keimfreien bzw. gnotobiotischen Tieren sind apparativ aufwendig, arbeitstechnisch erschwert und wegen der Kontaminationsgefahr risikoreich. Deshalb ist es - wie in der vorliegenden Arbeit - nicht außergewöhnlich, daß mit wenigen Tieren gearbeitet werden muß und - wegen der Einheitlichkeit des Materials und der Bedingungen - gearbeitet werden kann.
Gustafsson's Gruppe (SAXERHOLT et al., 1983) entdeckte die Bilirubin-Konjugation in den Faeces keimfreier Ratten an einer Gallengang-kanulierten keimfreien Ratte.
RAFTER und GUSTAFSSON (1983) bestimmten Mercapturic acid (MAP) als Endstufe von Propachlor im Stoffwechsel keimfreier Ratten an zwei Tieren.
BERGMAN et al. (1982) untersuchten den Stoffwechsel von 2, 4', 5-Trichlorobiphenyl an drei keimfreien Ratten.
KRAKOWA (1983) ermittelt die 'killer-cell'-Aktivität bei vier gnotobiotischen Hunden.

RUTTER (1983) verwendet für Infektionsversuche mit Bordetella bronchiseptica und Pasteurella multocida jeweils ein männliches und ein weibliches gnotobiotisches Ferkel. Für vergleichbare Untersuchungen zur Assoziation mit Clostridien setzten DUCLUZEAU et al. (1981) jeweils zwei gnotobiotische Ratten und Mäuse ein.

Die Keimzahlbestimmung cellulolytischer Mikroorganismen im Blinddarm von konventionellen Ratten mit Hilfe der Anaerobier-Technik und unter Anwendung von Selektivnährboden macht deutlich, daß die zellulosespaltenden Spezies einen bedeutenden Teil der Flora im Cäcum ausmacht. So wurden im Cäcum von Ratte (MACY, 1982), Meerschweinchen (DEHORITY, 1977), Kaninchen (HALL, 1952) und Pferd (DAVIES, 1964) Keimzahlen in der Größenordnung von 10^6 - 10^8 Keimen/g Blinddarminhalt gefunden.

MACY et al. (1982) geben den Anteil der cellulolytischen Keime mit 6 % der lebenden Mikroorganismen bei einer Gesamtkeimzahl von 72×10^8/g an.

In der vorliegenden Arbeit wurden im orientierenden Versuch (1.1.A) zur Ermittlung cellulolytischer Keime im Cäcum konventioneller Ratten bei unterschiedlichem Zellulosegehalt im Futter cellulolytische Keime in der Größenordnung von 10^8Keimen/g Cäcuminhalt ermittelt. Eine Abhängigkeit von der Menge der Zellulose im Futter wird sichtbar. Mit steigendem Zellulosegehalt erhöht sich auch die Anzahl der cellulolytischen Keime. Gleichzeitig läßt der Vergleich der Ergebnisse bei Gabe von Futter II ($10,5 \times 10^8$Keime/g Cäcuminhalt) und Futter IV ($28,5 \times 10^8$Keime/g Cäcuminhalt) bei gleichem Zellulosegehalt (5%) unterschiedlicher Quellen (II-synthetisch; IV-nativ) eine Abhängigkeit von der Art der verabreichten Zellulose vermuten.

Im Versuchsteil 1. 1. B wurden cellulolytische Keime im Kot ermittelt und in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt wurden als Mediane $2,3 \times 10^8$ bis 46×10^8 cellulolytische Keime/g Faeces nachgewiesen. Auch in dieser Versuchsreihe wird die Abhängigkeit der Zahl cellulolytischer Keime von Art und Menge der verabreichten Zellulose deutlich.
Durch Futter V wird mit 30% Zellulose nativer Quellen mit $21,4 \times 10^8$ Keimen/g Faeces nicht die höchste Keimzahl erreicht. Futter I - III zeigen wie in Versuchsreihe A mit steigendem Zellulosegehalt eine Zunahme der Anzahl cellulolytischer Keime.
In Kot und Cäcuminhalt ist nicht die gleiche Anzahl cellulolytischer Keime zu erwarten. Milieuveränderungen und unterschiedliche Nachweismethoden haben zwangsläufig einen starken Einfluß auf den Keimgehalt.
Es galt hier in erster Linie die Abhängigkeit des cellulolytischen Keimzahl vom Zellulosegehalt im Futter nachzuweisen und eine Größenordnung der Anzahl cellulolytischer Keime in Cäcuminhalt und Faeces zu ermitteln.
Die hohen Werte in der dritten Versuchswoche sowohl in Versuchsreihe A, als auch in Versuchsreihe B, werden offensichtlich durch eine Dynamik der Keimvermehrung hervorgerufen. Sie stellen ein Wirkungsoptimum dar, das durch Anpassung an das Futter entstanden ist, aber nicht dem Gleichgewicht aller wirkenden Kräfte entspricht.

Bei der Ermittlung der Cellulaseaktivität im Blinddarminhalt der Tiere aus dem Fütterungsversuch zeigt sich ein linearer Anstieg der Aktivität bei Futter I - III. Es stellt sich ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Zellulosegehalt im Futter, ermittelter Keimzahl und Cellulaseaktivität dar.

Durch Futter IV wird die höchste Cellulaseaktivität mit 1001,86 mU hervorgerufen, während die Gruppe V mit 30 % Zellulose im Futter mit 420,12 mU eine geringere Cellulaseaktivität aufweist.

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl die Anzahl der cellulolytischen Keime, als auch die Enzymaktivität wesentlich von der Art der verabreichten Zellulose mitbestimmt wird. MANDELS und WEBER (1969) haben 9 unterschiedliche Zellulosequellen in 5 %-iger Suspension auf den Umfang der Hydrolyse von T. viride-Cellulase bei 50° C geprüft und nach 15 Tagen Unterschiede von 11,8 % bis 68,7 % Hydrolyse erhalten.

Um cellulolytische Keime als Bestandteil einer standardisierten Flora anwenden zu können, ist es notwendig, sie isolieren und kultivieren zu können und zu wissen, ob sie einen notwendeigen Bestandteil der autochthonen Darmflora bilden.
Wichtig ist dabei, neben einer möglichst hohen cellulolytischen Aktivität, festzustellen, ob und welche Wirkung der isolierte Keim auf die „Normalisierung" bestimmter, dafür geeigneter Parameter hat.

Am Beispiel der Monoassoziation wurden hier anhand von drei aus Blinddärmen konventioneller Ratten gewonnenen Isolaten folgende Parameter - als Maß für einen Normalisierungseffekt - näher untersucht:

Magen-Darm-Gewichte (Magen, Dünndarm, Blinddarm, Enddarm)

Wassergehalt im Enddarm

Stickstoffgehalt im Enddarm

cellulolytische Aktivität

Zelluloseverwertung

Eine taxonomisch eindeutige Benennung der Isolate wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es konnte aber eine Zuordnung zu in anderen Arbeiten besprochenen Keimen auf Grund der ermittelten biochemischen Merkmale getroffen werden (DEHORITY, 1976; HUNGATE, 1957).

Die hier gewonnenen Isolate, im Verlauf der Arbeit mit 1 - 3 bezeichnet, zeigten eindeutig Zelluloseverdauung auf Selektivnährboden und konnten über längere Zeit in flüssigem Medium erhalten werden.

So standen zur Monoassoziation folgende Keime zur Verfügung:

Isolat 1 - gramnegative coccoide Stäbchen, die dunkle, teils gelbliche Kolonien mit unregelmäßigem Rand bildeten und deren Zentrum zum Teil leer war, mit schleimigem Randbereich.

Isolat 2 - grampositive Kokken, teils als Diplokokken oder kurze Ketten, die stecknadelkopfgroße weiße, runde Kolonien bildeten.

Isolat 3 - grampositive Stäbchen, teilweise mit terminaler Spore, die Kolonien mit dunklem Zentrum und fingerartigen Ausläufern bildeten.

Ein bewährter Parameter als Maß für einen Normalisierungseffekt im Rahmen von Assoziationen ist das Blinddarmreduktionsvermögen - relatives Blinddarmgewicht (NICOLAI-SCHOLTEN, 1976; LORENZ, 1981).

KOOPMAN (1976) benutzt zusätzlich die Parameter -

Redoxpotential im Blinddarm

pH im Blinddarm

Konzentration von E. coli in den Faeces 14 Tage nach Verabreichung von 10^5 E. coli Zellen pro Tier.

Unter Beobachtung der auf Seite 82 angeführten Parameter wurde die Wirkung der Monoassoziation der drei genannten Isolate geprüft, wobei eine Annäherung der gemessenen Werte an die Werte konventioneller Tiere als positives Ergebnis gewertet wurde.

Berücksichtigt man alle Parameter als Gesamtheit, so erreichen bei 5 % Zellulose im Futter die Tiere, die mit Isolat 2 assoziiert wurden, das beste Ergebnis. Das relative Blinddarmgewicht entspricht nahezu dem der konventionellen Tiere und alle anderen Werte nähern sich an. Isolat 3 zeigte bei 5 % Zellulose im Futter gegenüber den keimfreien Tieren keinen positiven Einfluß.

Die Ergebnisse bei 30 % Zellulose sind nur unter Berücksichtigung der physiologischen Abweichungen durch Mangelernährung zu beurteilen.

Zur Ermittlung des Assoziationserfolges schien eine Verabreichung von Bran Buds^{R} als Alleinfutter über 14 Tage vertretbar. Legt man bei der Ermittlung des Besiedlungserfolges das Hauptgewicht auf das Blinddarmreduktionsvermögen, so ist auch bei 30 % Zellulose im Futter ein positives Ergebnis zu verzeichnen, wobei mit Isolat 2 auch hier die besten Werte erzielt werden.

Auch Isolat 3 erwies sich als geeignet, zu einer Normalisierung der beobachteten Parameter beizutragen, hatte aber ein geringeres Blinddarmreduktionsvermögen.

In allen drei assoziierten Gruppen ließ sich cellulolytische Aktivität nachweisen, wobei die Wirkung von Isolat 1 am besten war.

Durch die Erhöhung des Zellulosegehaltes von 5 auf 30% konnte eine Steigerung der cellulolytischen Aktivität erreicht werden.

Die Zelluloseverwertung war in der mit Isolat 1 monoassoziierten Gruppe am besten . Bei Erhöhung des Zellulosegehaltes blieb die scheinbare Verdaulichkeit nahezu gleich.

Der Stickstoffgehalt im Enddarm wurde durch die Assoziation mit cellulolytischen Keimen nicht verringert, sondern erfuhr bis auf eine Ausnahme (Isolat 1 bei 30 % Zellulose im Futter) eine Erhöhung.

Die hohe fäkale Stickstoffausscheidung des keimfreien Tieres wird auf Stickstoff endogenen Ursprungs zurückgeführt, so Bestandteile aus Sekreten und Erosion der Darmmucosa. Nach EYSSEN (1973) dürfte die Darmflora bei der Rückgewinnung dieser endogenen Bestandteile durch Koprophagie eine Hauptrolle spielen und mikrobielle Enzyme scheinen dazu notwendig zu sein.

Die allgemeine Erhöhung des N-Gehaltes im Enddarm bei Monoassoziation mit den hier verwendeten Keimen läßt auf eine Bindung des Stickstoffs als bakterielles Protein schließen.

Mit Hilfe der Spaltung radioaktiv markierter Zellulose wurde in Versuch 3.6. die Auswirkung bakterieller Besiedlung auf die Zelluloseverwertung aufgezeigt. CONRAD et al. (1958) zeigten bereits, daß bei konventionellen Rattén nur die Hälfte des verabreichten C^{14} in den Faeces ausgeschieden wird.
In dieser Arbeit wurden neben konventionellen Ratten auch keimfreie Tiere und mit Isolat 1 assoziierte Tiere eingesetzt. Es wurde dabei deutlich, daß cellulolytische Aktivität ein Ergebnis mikrobieller Tätigkeit ist. Konventionelle Tiere atmen 35,8% der verabreichten C^{14}-Dosis ab, 5,9% lassen sich als "Ansatz" in Leber, Niere und Muskel nachweisen, 3,9% erscheinen im Urin und nur 58,6% der verabreichten Gesamtdosis treten als "nicht-resorbierter" Anteil im Gesamtdarminhalt wieder auf.
Beim assoziierten Tier wurde die Verwertung von Zellulose durch Assoziation mit einem cellulolytischen Keim(Isolat 1)

auf das Maß konventioneller Tiere gebracht. 27,3% der verabreichten C^{14}-Dosis werden abgeatmet, 9,1% erscheinen als "Ansatz" in Leber, Niere und Muskel, 3,6% werden im Urin ausgeschieden und nur 63,0% werden nicht resorbiert. Demnach verstoffwechselten die konventionellen Tiere 45,6% C^{14} der verabreichten Gesamtdosis und die assoziierten Tiere 40,0%.
Dagegen atmen die keimfreien Tiere nur 5,7-8,7% C^{14} ab, 5,4-8,6% lassen sich in den Organen nachweisen, 1,1-3,2% erscheinen im Urin und 80,8-89,6% treten als "nicht-resorbierter" Anteil im Darminhalt wieder auf.

Der Anteil gespaltener C^{14}- Dosis (5,7-8,7%) in der Keimfrei-Gruppe in der Atemluft läßt sich nach Versuchen, die unter 3.6. beschrieben und diskutiert sind, dadurch erklären, daß das Präparat einen Anteil durch die Verdauungsfermente des keimfreien Tieres aufschließbare C^{14}- Quelle enthält.
Für die Ergebnisse bedeutet das, daß die Keimfrei-Gruppe nicht Negativ-Kontrolle, sondern Basis-Wert darstellt.

Unter der Berücksichtigung vorliegender Informationen und der vorgelegten Befunde über Keimzahl, Aktivität und Zelluloseverwertung cellulolytischer Keime, sowie der Wirkung cellulolytischer Keime auf den Wirt in symbiotischer Assoziation, läßt sich feststellen, daß cellulolytische Keime bei der Entwicklung einer standardisierten Mikroflora zur Assoziation eine wichtige Rolle spielen. Die positive Wirkung bei Monoassoziation auf den Wirt konnte eindeutig nachgewiesen werden.

Der normalisierende Effekt auf keimfreie Ratten, der schon durch Monoassoziation erreicht wurde, bestätigt die Einsatzmöglichkeit dieser Keime.

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Isolaten anderer enzymatischer Aktivitäten (mukolytisch, lipolytisch) sollte über längere Sicht die Verwirklichung einer standardisierten Mikroflora möglich sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Vorkommen und Bedeutung cellulolytischer Keime als Bestandteil der Mikroflora konventioneller Laboratoriumsratten und ihre Eignung zur Assoziation wurde an keimfreien Ratten untersucht.

Im ersten Schritt wurden kulturelle Bestimmungen der Anzahl von Keimen mit cellulolytischer Aktivität im Blinddarm konventioneller Ratten durchgeführt und ihre Cellulaseaktivität ermittelt.

Die Untersuchungen erfolgten in Abhängigkeit vom Zellulosegehalt (0/ 5/ 10/ 5/ 30 %) im Futter (I, II, III, IV, V). Dabei ließen sich im Blinddarminhalt (Versuchsreihe A) Keimzahlen in der Größenordnung von 10^8/g Blinddarminhalt, in den Faeces (Versuchsreihe B) Keimzahlen (angegeben als Medianwerte) von 2, 3 x 10^8 bis 46 x 10^8/g Faeces ermitteln.
Es wurde die Tendenz sichtbar, daß mit zunehmendem Zellulosegehalt und in Abhängigkeit von der Art der verabreichten Zellulose die Anzahl der cellulolytischen Keime und die Cellulaseaktivität stiegen.

Im zweiten Schritt wurden unter Anwendung substratspezifischer Selektion fünf Keimspezies isoliert, von denen drei Isolate definiert an keimfreie Ratten assoziiert wurden, um eine Beurteilung der Wirkung auf den Makroorganismus - unter dem Gesichtspunkt morphologischer und physiologischer Normalität - zu ermöglichen. Hierbei zeigte sich folgendes:

---- Die verabreichten Keime ließen sich in den assoziierten Tieren nachweisen.

---- Eine Annäherung der beobachteten Parameter (relatives Blinddarmgewicht, Stickstoffgehalt im Enddarm) an Werte konventioneller Tiere trat generell bei allen assoziierten Versuchsgruppen auf. Die befriedigendsten Ergebnisse wurden mit Isolat 2 (grampositive Kokken) erzielt. Bei 5% Zellulose im Futter ist das Blinddarmreduktionsvermögen dem der "Normalflora" konventioneller Tiere vergleichbar.
Der Stickstoffgehalt nahm bei allen assoziierten Tieren gegenüber den keimfreien Tieren zu.

---- Cellulolytische Aktivität und Zelluloseverwertung erreichen bei Monoassoziation Werte konventioneller Tiere.

---- Bei der Verwertung von C^{14}-markierter Zellulose erreichten die assoziierten Tiere mit 27, 3% der verabreichten Gesamtdosis Ausscheidungswerte in der Atemluft, die denen der konventionellen Tiere entsprechen (35, 8%). Im "Ansatz" wurden 9, 1% und im Urin 3, 6% C^{14} nachgewiesen.und 63, 0% treten als nicht-resorbierter Anteil im Gesamtdarminhalt auf. Demnach verstoffwechselten die assoziierten Tiere 40, 0% der verabreichten Gesamtdosis C^{14} gegenüber 45, 6% bei konventionellen Tieren.

Die Wichtigkeit cellulolytischer Keime zur Herstellung physiologischer Bedingungen im Verdauundskanal keimfreier Ratten wird deutlich. Cellulolyten sollten einen festen Bestandteil der zu entwickelnden definierten, pathogenfreien, leistungsfähigen und stabilen Flora zur Assoziation bilden.

SUMMARY

Occurence and importance of cellulolytic bacteria as components of the microflora in conventional rats and their suitability for association was investigated on germ-free rats.

The number of microorganisms in the cecum of conventional rats with cellulolytic activity were established and cellulase-activity determined.

The investigations occured in dependence of the content of cellulose (0/5/10/5/30 %) in the food (I, II, III, IV, V).
In cecum-content (experiment A) there were found high numbers of cellulolytic bacteria (10^8/g cecum-content), in feces (experiment B) 2,3 x 10^8 to 46 x 10^8 cellulolytic bacteria/g feces were found.
You can see the tendency, that the number of cellulolytic bacteria and their cellulase-activity increased with rising content of cellulose in the food. That also depends on the sort of cellulose which was fed.

Five cellulolytic species of microorganisms were isolated from the cecum of conventional rats using substrat-specific selection. Three of these isolats were associated to germ-free rats to make possible a judgement of the effect to the microorganisms under the point of view of morphological and physiological standard. The following results were achieved:

----The cellulolytic microorganisms can be proved in the associated animals.

---- An approachment of the observed parameters(relative cecum-weight, content of nitrogen in the colon and rectum) towards the results of conventional animals was seen in every associating-test. Isolat 2 (grampositiv coccus) turned out to reach the best results. If there were 5% cellulose in the food the reduction of cecum-weight was equal to the "normal - flora" of conventional animals.

The content of nitrogen increased by all associated rats compared to the germ-free rats.

---- Cellulolytic activity and utilization of cellulose by monoassociated rats came up to the results of conventional animals.

----Digestibility of labeled carbon-14 cellulose shows that the associated rats were able to convert nearly the same portion of the ingested cellulose to a form which the rat absorbs and metabolizes like the conventional rats.
Associated rats expired 27, 3% C^{14} fed the rats, 9, 1% were found in organs and 3, 6% in urine. Conventional rats expired 35, 8%, 5, 9% were found in organs and 3, 9% in urine. The rest were found in the feces.

Therefore the associated animals digested 40, 0% of the C^{14} fed the rats in opposite to 45, 6% by conventional animals.

The importance of cellulolytic bacteria to get physiological conditions in the gastrointestinal tract of germfree rats was shown.

A defined, pathogenic-free, efficient and stable flora must be developed for association.

Cellulolytic germs should constitute a regular component of this flora.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

BERGNER, H. (1982):
Die Bedeutung der Rohfaser in der Ernährung von Monogastriden.
Mh. Vet. Med., 37, 58-66

BERGNER, H., O. SIMON und M. ZIMMER (1975):
Einfluß des Gehaltes nativer Rohfaser in Diäten von Ratten auf die Aminosäureresorption.
Arch. Tierernährung, 25, 95-104

BERGMAN, A., A. BIESSMANN, I. BRANDT und J. RAFTER (1982):
Metabolism of 2, 4', 5-Trichlorobiphenyl: Role of the intestinal microflora in the formation of bronchialseeking methyl sulphone metabolites in mice.
Chem.-Biol. Interactions, 40 , 123-131

BEST, W. R. (1970):
On the logarithmic transformation of intestinal bacterial counts.
Am. J. clin. Nutr., 23 , 1608-1609

BETIAN, H. G., B. A. LINEHAN, M. P. BRYANT und L. V. HOLDEMAN (1977):
Isolation of a cellulolytic Bacteroides sp. from human feces.
Appl. Environ. Microbiol., 4, 1009-1010

BOND, J. H. und M. D. LEVITT (1976):
Quantitative measurement of lactose absorption.
Kl. Gastroenterology, 70, 1058

BRANDON, D. G. (1979):
Isolation of an anaerobic cellulolytic mixed culture.
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 281-288

BRYANT, M. P. (1973):
Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria.
Fed. Proc., 32, 1809-1813

BRYANT, M. P. (1978):
Cellulose digesting bacteria from human feces.
Am. J. clin. Nutr., 31, 113-115

BRYANT, M. P. und L. A. BURKEY (1953):
Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen.
J. Dairy Sci. 36, 205-216

BRYANT, M. P. und N. SMALL (1956):
The anaerobic monotrichous butyric acid producing curved rod shaped bacteria of the rumen.
J. Bact. 72, 16-21

BRYANT, M. P., N. SMALL, C. BOUMA und H. CHU (1958):
Bacteroides ruminocola n. sp. and Succinomonas amylolytica, the new genus and species.
J. Bact., 76, 15-23

CALDWELL, D. R. und M. P. BRYANT (1966):
Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria.
Appl. Microbiol., 14, 794-801

CONRAD, H. E., W. R. WATTS, J. M. JACONO, H. F. KRAYBILL und T. E. FRIEDEMANN (1958):
Digestibility of uniformly labeled carbon-14-soybean cellulose in rat.
Science, N. Y. 127, 1293

DAVIES, M. E. (1964):
Cellulolytic bacteria isolated from the large intestine of the horse.
J. appl. Bact. 27, 373

DAVIES, M. E. (1971):
Isolation of cellulolytic bacteria from the large intestine of the horse.
in: Isolation of anaerobes. D. A. Shapton und R. G. Board (Hrsg.)
Acad. Press., London, New York, 125-131

DEHORITY, B. A. (1961):
Effect of particle size on the digestion rate of purified Cellulose by rumen cellulolytic bacteria in vitro.
J. Dairy Sci., 44, 687-692

DEHORITY, B. A. (1977):
Cellulolytic cocci isolated from the cecum of guinea pigs (cavia porcellus).
Appl. Environ. Microbiol., 6, 1278-1283

DEHORITY, B. A. und J. A. GRUBB (1976):
Basal medium for the selective enumeration of rumen bacteria utilizing energy sources.
Appl. Environ. Microbiol., 5, 703-710

DEMEYER, D. und D. GIESECKE (1973):
Abbau der Kohlenhydrate und Biochemie der Gärung im Pansen.
in: D. Giesecke und H. K. Henderickx (Hrsg.):
Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung
BLV Verlagsgesellschaft München-Bern-Wien, 137-167

DUCLUZEAU, R., P. RAIBAUD, F. DUBOS, A. CLARA und C. LHUILLERY (1981):
Remanent effect of some dietary regimens on the establishment of two Clostridium strains in the digestiv tract of gnotobiotic mice.
Am. J. clin. Nutr., 34 , 520-526

EYSSEN, H. (1973):
Die Gnotobiologie der Nichtwiederkäuer.
in: D. Giesecke und H. Henderickx (Hrsg.):
Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung
BLV Verlagsgesellschaft München-Bern-Wien, 339-368

FÄHNRICH, P., K. IRRGANG, B. RÜTTEN und
K.-L. SCHIMZ (1981):
Abbau von Cellulose in cellulosehaltigem Material durch
Mikroorganismen sowie durch mikrobielle Enzymsysteme.
Das Papier, 35 10A, V1 -V9

FLEMNG, S. E. und B. LEE (1983):
Growth performance and intestinal transit time of rats
fed purified and natural dietary fibers.
J. Nutr., 113 , 592-601

FROMME, H. G. und M. PFAUTSCH (1975):
Kritische-Punkt-Trocknung.
Meth.-Elmi. 7, 3-10

GASCOIGNE, J. A., M. M. GASCOIGNE (1960):
Biological degradiation of cellulolse.
Butterworth, London

GERBER, H.-CH. (1974):
Parasiten bei Gnotobioten.
Tierlaboratorium, 1 , 85-92

GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE (1972):
Liste von Erregern zur Spezifizierung bei SPF-Versuchs-
tieren.
Veröffentlichungen der Gesellschaft für Versuchstier-
kunde. Nr. 2 Zürich

GIESECKE, D. (1973):
Biologie und Biochemie der Bakterien im Pansen.
in: Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung
D. Giesecke und H. K. Henderickx (Hrsg.):
BLV Verlagsgesellchaft München-Bern-Wien, 9-57

GROLEAU, D. und C. W. FORSBERG (1981):
Cellulolytic activity of the rumen bacterium Bacteroides succinogenes.
Canad. J. Microbiol. 27, 517-530

GRUBER, F. (1974):
Auf dem Weg zur Antigenfreiheit.
Tierlaboratorium 1, 93-100

HALL, E. R. (1952):
Investigations on the microbiology of cellulose utilization in domestic rabbits.
J. gen. Microbiol. 7, 350-357

HANKIN, L. u. ANAGNOSTAKIS (1977):
Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_x-cellulase activity of microorganisms.
J. gen. Microbiol. 98 , 109 - 115

HILDEBRANDT, G. und G. ARNDT (1983):
Die MPN-Schätzung in Theorie und Praxis.
Fleischwirtschaft, 62 , 357 -363, 517--519

HOBSON, P. N. u. S. O. MANN (1971):
Isolation of cellulolytic and lipolytic organims from the rumen.
In:D. A. Shapton and R. G. Board (Hrsg.):
Isolation of anaerobes.
Academic Press, New Yorck-London, 149 - 158

HOLM, K.A. (1978):
Automated colorimetric determination of cellulase activity in fermentation samples using a Ferrycyanid-Molybdoarsenic acid reagent.
Anal. Biochem. 84 , 522 - 532

HUNGATE, R.E. (1944):
Studies on cellulose fermentation.
I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium.
J. Bact. 48 , 499

HUNGATE, R.E. (1947):
Studies on cellulose fermentation.
III. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle.
J. Bact. 53 , 631 - 645

HUNGATE, R.E. (1950):
The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria.
Bact. Rev. 14 , 1 -49

HUNGATE, R.E. (1957):
Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration.
Can. J. Microbiol. 3 , 289 - 311

HUNGATE, R.E. (1966):
The rumen and its microbes.
Academic Press, New York-London

HUNGATE, R.E. (1969):
Methods in Microbiology.
Academic Press, New York-London

IFKOVITS, R. W., H. S. RAGHEB, R. F. BARNES u. L. V. PACKETT (1965):
A pure-culture inoculum method for evaluation of forage cellulose digestibility.
J. Anim. Sci. 24 , 1092 - 1099

JUHR, N. -C. (1972):
Die Cäcomegalie keimfreier Nager.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 85 , 4 - 9

JUHR, N. -C. (1974):
Gnotobiotische Modelle im Tierexperiment.
Tierlaboratorium 1 , 7 - 21

JUHR, N. -C. (1975):
Der mikrobielle Faktor im Ernährungsversuch, Einfluß von Koprophagieverhinderung und Cäcektomie bei keimfreien und konventionellen Ratten.
Tierlaboratorium 2 , 173 - 207

JUHR, N. -C. (1976):
Probleme der symbiontischen Assoziation.
Tierlaboratorium 3 , 240 - 249

JUHR, N. -C. (1977):
Mikrobielle Definition von Versuchstieren - Möglichkeiten der Standardisierung.
Tierlaboratorium 4 , 57 - 63

JUHR, N. -C. (1979):
Der mikrobielle Faktor bei der Ernährung der Laboratoriumsnager - Beeinflußung des Ernährungsversuches.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 92 , 158 - 162

JUHR, N.-C. (1980):
Intestinale Enzymaktivität bei keimfreien und konventionellen Ratten und Mäusen.
Z. Versuchstierk. 22 , 197 - 203

JUHR, N.-C. (1981):
Gnotobiotechnik - Gnotobiologie ; Methode und Arbeitsrichtung in der Versuchstierkunde.
Tierlaboratorium 7 , 153 - 176

JUHR, N.-C. u. A. HAAS (1975):
Cellulolytische Aktivität im Cäcuminhalt von Maus, Ratte, Goldhamster, Meerschweinchen und Kaninchen.
Z. Versuchstierk. 18 , 129 - 140

JUHR, N.-C. u. A. HAAS (1979):
Substrate-specific selective culture of cellulose splitting intestinal bacteria of small laboratory rodents.
Vet. Sci. Comm. 2 , 323 - 329

JUHR, N.-C. und H. H. HILLER (1979):
Einfluß des Ballaststoffgehaltes im Futter auf Körpergewichtsentwicklung, Futterverzehr und -verdaulichkeit und mikrobielle Besiedlung bei Ratten und Meerschweinchen.
Tierlaboratorium 6 , 69 - 78

KAMETAKA, M. (1973):
Mikrobiologie der Verdauung beim Kaninchen.
in: Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung
D. Giesecke und H. K. Henderickx (Hrsg.)
BLV Verlagsgesellschaft München-Bern-Wien, 283 - 292

KAPER, J. B., A. L. MILLS, und R. R. COLWELL (1978):
Evaluation of the accuracy and precision of enumerating aerobic heterotrophs in water samples by the spread plate method.
Appl. Environ. Microbiol., 35 , 756-761

KHOUVINE, Y. (1923):
Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme.
B. cellulosae dissolvens, n. sp.
Ann. Inst. Pasteur 37 , 711

KOMAI, M. und S. KIMURA (1980):
Gastrointestinal responses to graded levels of cellulose feeding in conventional and germ-free mice.
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 26 , 389 - 399

KOMAI, M. und S. KIMURA (1981):
Effect of dietary fiber on the function of the alimentery tract in germ-free mice.
Rec. adv. Germfree Res. , 373 - 378

KOMAI, M., F. TAKAHISA und S. KIMURA (1982):
Effect of dietary fiber on intestinal epithelial cell kinetics of germ-free and conventional mice.
Nutr. Rep. Int. 26, 255 - 261

KOOPMAN, J. P. (1976):
Standardisierte Mikrofloren: Utopie oder Realität.
Tierlaboratorium 3 , 263 - 268

KOOPMAN, J. P., H. M. KENNIS, A. LANKHORST, A. M. STADHOUDERS und H. DE BOER (1982):
The influence of microflora and diet on gastrointestinal parameters.
Z. Versuchstierk. 24 , 184 - 192

KOOPMAN, J. P., J. P. VAN OEVEREN, F. G. J. JANSSEN (1973):
Use of combusted natural gas cultivate the anaerobic bacterial flora from the cecum contents of mice.
Appl. Microbiol. 26 , 584 - 588

KRAKOWKA, S. (1983):
Natural killer cell activity in adult gnotobiotic dogs.
Amer. J. vet. Res., 44, 635-638

KRELINOVA, O., V. JIRKU und J. SKODA (1977):
The cellulolytic activity of some intestinal bacteria of termites.
Int. Biodeterior. Bull., 13 , 81-87

KRUMBACH, F. (1981):
Rohfaserwirkungen auf Passagerate und die Verdaulichkeit von Energie, Rohfaser und Cellulose.
München, vet. med. Diss.

KÜRSCHNER, K. und A. HANAK (1930):
Zur Bestimmung der sogenannten Rohfaser.
Z. Unters. Lebensmittel. 59 , 484 - 494

LAMED, R., E. SETTER, R. KENIG und E. A. BAYER:(1984):
The cellulosome - a discrete cell surface organelle or Clostridium thermocellum which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities.
Biotechnol. Bioeng. Symp., 13 , 163-181

LEATHERWOOD, J. M. (1965):
Cellulase from ruminococcus albus and mixed rumen microorganisms .
Appl. Microbiol. 13, 771 - 775

LORENZ, R. (1981):
Untersuchungen über die Eignung einer thermoduren Flora zur Assoziation von Laboratoriumsnagern.
Berlin, FU, vet. med. Diss.

MACY, J. M., J. R. FARRAND und L. MONTGOMERY (1982):
Cellulolytic and non-cellulolytic bacteria in rat gastrointestinal tracts.
Appl. Environ. Microbiol. 6 , 1428 - 1434

MACDONELL, M. T., E. RUSSEK und R. R. COLWELL (1984):
An interactive microcomputer program for the computation of most probable number.
J. Microbiol. Meth., 2 , 1-7

de MAN, J. C. (1975):
The probality of most probable numbers.
European J. Appl. Microbiol., 1 , 67-78

MANDELS, M. und E. T. REESE (1964):
Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric.
Develop. Ind. Microbiol. 5 , 5 - 20

MANDELS, M. und J. WEBER (1969):
The production of cellulases.
Adv. Chem. Ser. Washington 95 , 391 - 414

MANN, S. O. (1968):
An improved method for determining cellulolytic activity in anaerobic bacteria.
J. appl. Bact. 31 , 241 - 244

MC BEE, R. H. (1953):
Manometric method for the evaluation of microbial activity of rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses.
Appl. Microbiol. 1 , 106 - 110

MEISKE, J. C., R. L. SALSBURY, J. A. HOEFER und R. W. LUECKE (1958):
The effect of stavation and subsequent refeeding on some activities of rumen microorganisms in vitro.
J. Anim. Sci. 17 , 774

MESLIN, J. C., E. SACQUET und M. RIOTTOT (1981):
Effect of various modifications in the diet on ileal epithelium renewal in germ-free and conventional rats.
Reprod. Nutr. Dévelop. 21 , (5A), 651 - 659

MLLER, G. L., R. BLUM, W. E. GLENNON und
A. L. BURTON (1960):
Measurement of carboxymethylcellulase activity.
Anal. Biochem. 2 , 127 - 132

MILTON-THOMPSON, G. H. und B. LEWIS (1971):
The breakdown of dietary cellulose in man.
Gut. 12 , 853 - 854

MOROTOMI, M., T. WATANABE, N. SUEGARA, Y. KAWAI
und M. MUTAI (1975):
Distribution of indigenous bacteria in the digestive tract
of conventional and gnotobiotic rats.
Infect. Immun. 11 , 962 - 968

MONTGOMERY, L. und J. M. MACY (1982):
Characterization of rat cecum cellulolytic bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 6 , 1435 - 1443

NYMAN, M. und N.G. ASP (1982):
Fermentation of dietary fiber components in the rat
intestinal tract.
Br. J. Nutr. 47 , 357 - 366

PARKER, D. S. (1976):
The measurement of production rates of volile fatty acids
in the cecum of the conscious rabbit.
Brit. J. Nutr. 36 , 61 - 70
zit. n. N.-C. Juhr (1979)

PITTERMANN, W. und F. DEERBERG (1976):
Der Einfluß ubiquitärer Keimarten auf SPF-Zuchten aus
der Sicht der Pathologie.
Tierlaboratorium 3, 283 - 285

RAFTER, J. J. und J.-A. GUSTAFFSON (1983):
Studies on the re-establishment of the intestinal microflora in
germ-free rats with special reference to the metabolism of
N-isopropyl- -chlotoacetanilide (propachlor).
Xenobiotica, 13, 171 - 178

REYNIERS, J. A. (1957):
The control of colonies of laboratory animals by use of germ-free technics.
Proc. Anim. Care Panel 7 , 9

RIOTTOT, M., E. SACQUET, C. LEPRINCE (1984):
Effect of Wheat Bran upon Gastro-Intestinal Transit in Germ-Free and Conventional Rats.
Digestion, 29, 37-41

ROSBURY, T. (1962):
Microorganisms indigenous to man.
McGraw-Hill book co. Inc. New York, 336

RUTTER, J. M. (1983):
Virulence of Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with Bordetella bronchiseptica.
Vet. Sci., 34, 287-295

SACHS, L. (1969):
Statistische Auswertungsmethoden.
Berlin, Heidelberg, New York; Springer(zweite Aufl.)

SACQUET, E., C. LEPRINCE und M. RIOTTOT (1982):
Dietary fiber and cholesterol and bile acid metabolisms in axenic (germ-free) and holoxenic (conventional) rats.
I. Effect of wheat bran.
Reprod. Nutr. Dévelop. 22 291 - 305

- - - - (1982):
Dietary fiber and cholesterol and bile acid metabolisms in axeni (germ-free) and holoxenic (conventional) rats.
II. Effect of pectin.
Reprod. Nutr. Dévelop. 22 575 - 581

SAVAGE, D. C., J. E. SIEGEL, J. E. SNELLEN und D. D. WHITT (1981):
Transit time of epithelial cells in the small intestines of germ-free mice and ex-germ-free mice associated with indigenous microorganisms.
Appl. Environ. Microbiol. 42 , 996 - 1001

SAXERHOLT, H. ; T. MIDTVEDT; und B. E. GUSTAFSSON (1983):
Detection of bilirubin conjugates in faeces of germfree rats.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43 , 477-481

SCHUMACHER, G. F. B. und W.-B. SCHILL (1972):
Radial difussion in gel for micro determination of enzymes.
II. Plasminogen activator, elastase and nonspecific protease.
Analyt. Biochem. 48 , 9 - 26

SHANE, B. S., L. GOUWS und A. KISTNER (1969):
Cellulolytic bacteria occuring in the rumen of sheep conditioned to low-protein teff hay.
J. gen. Microbiol. 55 , 445 - 457

SIJPSTEIJN, A. K. (1951):
On ruminococcus flavefaciens a cellulose-decomdosing bacterium from the rumen of sheep and cattle.
J. gen. Microbiol. 5 , 869

SMITH, H. W. (1965):
Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition.
J. Path. Bact. 89 , 95 - 122

SMITH, R. E. (1977):
Rapid tube test for detecting fungal cellulase production.
Appl. Environ. Microbiol., 33 , 980-981

SPIEGEL, A. (1976):
Versuchstiere: Eine Einführung in die Grundlagen ihrer Zucht und Haltung.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

SUMNER, J. B. und E. B. SISLER (1944):
A simple method for blood sugar.
Arch. Biochem. 4 , 333 - 336

TAKEHISA, F., T. SUZUKI und S. KIMURA (1979):
Effect of cellulose indestion on alimentary canal in mice.
J. Japanese soc. Food Nutr. 32 , 187 - 190

TANNOCK, G. W. (1977):
Characteristics of bacteroides isolates from the cecum of conventional mice.
Appl. Environ. Microbiol. 4 , 745 - 750

THUNERT, A. (1971):
Bakteriologische Beobachtungen an Ratten (Wistar AF/Han) und Mäusen (NMRI/Han), die in Häusern mit einer hygienischen Barriere gezüchtet wurden.
Z. Versuchstierk. 13 , 87 - 92

VAHERI, M. P., M. E. O. VAHERI und V. S. KAUPPINEN (1979):
Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of Trichoderma reesei on cellobiose and glycerol.
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8 , 73 - 80

VAN GLYSWYK, N. D. (1968):
The cellulolytic bacteria of sheep fed supplemented hay diets.
M. Sc. thesis, University of Pretoria, Pretoria

VAREL, V. H., S. J. FRYDA und I. M. ROBINSON (1984):
Cellulytic bacteria from pig large intestine.
Appl. Environ. Microbiol., 47 , 219-221

WAAIJ, D. VAN DER, J. M. BERGHUIS DE VRIES und J. E. C. LEKKERKERK VAN DER WEES (1971):
Colonisation resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice.
J. Hyg. Camb. 69 , 405 - 411

WALSETH, C. S. (1952):
Occurence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms.
TAPPI 35, 228 - 233

WHITTLE, D. J., D. G. KILBURN, R. A. J. WARREN, R. C. MILLER Jr. (1982):
Molecular cloning of a Cellulomonas fimi cellulase gene in Escherichia coli.
Gene, 17, 139-145

WINTER, J. und J. WIEGEL (1981):
Der anaerobe Abbau von Cellulose zu Methan.
Forum Microbiol. 4 , 202 - 208

WOOD, T. M. (1968):
Cellulolytic enzyme system of trichoderma koningii.
Biochem. J. 109 , 217 - 227

YANG, M. G., W. G. BERGEN, A. E. SCUTHORPE und O. MICKELSON (1971):
Utilization of ^{14}C-labelled E. coli by the rat cecum and after force-feeding.
Proc. Soc. exper. Biol. Med. 139 , 1312 - 1316

ZILLMANN, U. (1977):
Parasitologische Routinekontrolle definierter und nicht definierter Versuchstiere.
(SPF-Tiere und konventionelle Tiere).
Tierlaboratorium 4 , 155 - 169

VII. ANHANG

Cellulose-Agar (CMC-Agar)	1g Carboxymethylcellulose 1, 5 g Agarose 100 ml aqua dest. aufkochen, 2o min bei 121°C autoclavieren, dünn gießen	
Flüssignährmedium (HOBSON u. MANN, 1971)	Caseinhydrolysat	0, 25 g
	Hefe-Extrakt	0, 06 g
	Cystein HCl	0, 05 g
	Na_2CO_3	0, 4 g
	Resazurin 0, 1%	0, 1 ml
	Minerallsg. A	15, 0 ml
	Minerallsg. B	15, 0 ml
	zentrifugierter Pansensaft	10, 0 ml
	dest. Wasser	60, 0 ml
Substrat	1 % Carboxymethylcellulose	
Minerallsg. A (g/l):	KH_2PO_4	3, 0g
	$(NH_4)_2SO_4$	6, 0g
	NaCl	6, 0g
	$MgSO_4$	0, 6g
	$CaCl_2$	0, 6g
Minerallsg. B (g/l):	K_2HPO_4	3, 0g

Futter	I	II	III	VI
Sojamin 90 (%)	2o	2o	2o	2o
Maisstärke (%)	66, 75	61, 75	56, 75	51, 75
Sojaöl (%)	5, o	5, o	5, o	5, o
Zellulosepulver (%)	----	5, o	1o, o	15, o
Vit. Mischung (%)	3, o	3, o	3, o	3, o
Mineral. Mischung (%)	5, o	5, o	5, o	5, o
DL-Methionin (%)	o, 25	o, 25	o, 25	o, 25

Futter IV Altromin 1324 fortified
Rohfasergehalt 6, 0 % entspricht 5% Zellulose

Futter V Kellogg's Bran Buds®
Rohfasergehalt 33 % entspricht 30% Zellulose

Tabelle 14
MPN-Schätzung mit entsprechendem
95% Konfidenzintervall

2, 0	(0, 5	-	7, 1)
2, 1	(0, 6	-	7, 3)
2, 3	(0, 4	-	10, 1)
3, 4	(0, 1	-	13, 3)
3, 9	(0, 5	-	26, 6)
4, 3	(0, 5	-	34, 4)
9, 3	(2, 3	-	37, 5)
14, 9	(4, 1	-	53, 5)
21, 4	(6, 0	-	74, 9)
24, 0	(2, 0	-	285, 4)
46, 0	(1, 9	-	1095, 7)
110, 0	(5, 8	-	2065, 0)

Spannweite der Keimzahlen x 10^8 ermittelt im Blinddarminhalt konventioneller Ratten (Versuch 1. 1. A.; Tabelle 4, S. 44)

Tabelle 15

2, 5	(	1, 1	-	3, 3)
2, 8	(	1, 9	-	4, 3)
3, 1	(	2, 5	-	3, 7)
3, 3	(	2, 1	-	4, 4)
4, 6	(	2, 8	-	5, 6)
4, 7	(	3, 9	-	5, 8)
4, 9	(	3, 5	-	6, 1)
5, 4	(	4, 5	-	6, 3)
6, 3	(	4, 3	-	7, 9)
8, 8	(	7, 9	-	10, 2)
10, 5	(	9, 2	-	12, 2)
14, 9	(	11, 3	-	17, 1)
15, 2	(	10, 8	-	20, 1)
20, 8	(	17	-	25, 3)
26, 6	(	24, 3	-	28, 3)
28, 5	(	27	-	31, 2)
30	(	25, 6	-	36, 3)
32, 5	(	29	-	36, 8)
36, 8	(	3, 22	-	42, 3)
42, 5	(	35	-	50, 4)
60	(	42, 8	-	92, 6)
72, 5	(	65, 5	-	82)
105	(	99, 7	-	115, 1)
107, 5	(	99, 3	-	123, 4)
117, 5	(	112, 8	-	121)

Bei Herrn Prof. Dr. Juhr möchte ich mich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeiten im Institut und für seine Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Hellmann für die kritische Durchsicht der Arbeit und für seine Anregungen.

Für die technische Hilfe danke ich Frau Godglück und Frau Koch. Frau Strauß sei für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen gedankt. Herrn Franke gilt mein Dank für die beratende Betreuung beim Isotopen-Versuch.

LEBENSLAUF

Am 20. 1. 1953 wurde ich, Heidemarie Ratsch, geb. Berlin, als Tochter des Ernst Ludwig Heinrich Berlin und seiner Ehefrau Lieselotte Bertha Maria Berlin, geb. Fölschow, in Hamburg geboren.

Nach den Grundschuljahren von 1959 - 1963 in Hamburg - Neugraben besuchte ich von 1963 - 1971 das Gymnasium am Schwarzenberg in Hamburg - Harburg. Dort legte ich am 18. 11. 1971 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1972 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin und legte dort am 2. 4. 1974 die Tierärztliche Vorprüfung ab.

Am 12. 1. 1978 bestand ich den 3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung und erhielt am 9. 2. 1978 die Approbation als Tierarzt.

Zur Anfertigung meiner vorliegenden Dissertation arbeitete ich von September 1979 bis November 1984 im Institut für Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten der Freien Universität Berlin.